
ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LES LEISHMANIOSES CHEZ LES ANIMAUX

par A. LAVERAN.

L'étude des leishmanioses naturelles ou expérimentales chez les animaux présente un grand intérêt; la leishmaniose naturelle du chien est probablement de même nature que le kala-azar infantile ou méditerranéen, et il est vraisemblable que le chien joue un rôle dans la propagation de cette maladie. L'étude des leishmanioses humaines est difficile quand on se borne aux faits que peuvent fournir l'observation des malades et les nécropsies; grâce à la réceptivité de certains animaux pour les *Leishmania*, nous pouvons étudier à loisir, dans les laboratoires, beaucoup de problèmes d'une grande importance, tels que les modes de transmission des *Leishmania* et les caractères communs ou distinctifs des différents virus, d'après les infections auxquelles ils donnent lieu chez différentes espèces animales. J'étudierai successivement :

- I. La leishmaniose naturelle du chien;
- II. Les infections expérimentales produites par la *L. infantum*;
- III. Les infections expérimentales produites par la *L. Donovanii*;
- IV. Les infections naturelles ou expérimentales produites par la *L. tropica*.

I. — LEISHMANIOSE CANINE NATURELLE

HISTORIQUE. RÉPARTITION. — En 1908, C. Nicolle et C. Comte ont publié la première observation de leishmaniose naturelle du chien (1). Il s'agissait d'un caniche noir, très amaigri, présentant un écoulement purulent d'une des oreilles, asphyxié à la fourrière de Tunis. La rate était un peu hypertrophiée. Des *Leishmania* existaient en assez grand nombre dans la rate et dans la moelle osseuse, en très petit nombre dans le foie.

C. Nicolle et C. Comte qui, en 1908, ont examiné 222 cadavres de chiens provenant de la fourrière de Tunis, ont constaté que 4 de ces animaux, soit 1,8 p. 100, étaient atteints de leishmaniose (2). De 31 chiens des environs de Tunis, de Gafsa et de Sfax examinés, aucun ne fut trouvé infecté.

Ces faits ont été confirmés par un grand nombre d'observateurs, non seulement pour la Tunisie, mais pour toutes les régions dans lesquelles le kala-azar infantile existe à l'état endémique.

W.-L. Yakimoff et M^{me} Yakimoff qui ont répété, à Tunis, les recherches de Nicolle et Comte sur les chiens de la fourrière (3) ont trouvé 5 chiens infectés de leishmaniose sur 299, soit une proportion 1,67 p. 100, presque identique à celle signalée par Nicolle et Comte. L'infection était légère chez 2 chiens, forte chez les 3 autres.

Gray, qui a repris ces recherches à Tunis, a constaté l'infection de 2 chiens sur 127 examinés, soit une proportion de 1,6 p. 100 (4).

Enfin C. Nicolle, dans une dernière série de recherches, sur les chiens sacrifiés à la fourrière de Tunis, mais qui n'a porté, cette fois, que sur les chiens maigres et malades, au lieu de porter, comme précédemment, sur l'ensemble des animaux, a trouvé que la proportion des chiens infectés de leishmaniose

(1) C. NICOLLE et C. COMTE, *Acad. des Sciences*, 6 avril 1908.

(2) C. NICOLLE et C. COMTE, *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1908, p. 109.

(3) W.-L. YAKIMOFF et N. KOHL-YAKIMOFF, *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1911, fasc. 4.

(4) A.-C.-H. GRAY, *Soc. de path. exotique*, 12 mars 1913.

était de 5,50 p. 100. Cette proportion a été à peu près la même aux différentes saisons (1).

En dehors des enquêtes systématiques faites à Tunis, 2 chiens atteints de leishmaniose ont été observés, le premier par C. Nicolle à Khereddine, près de La Goulette (Tunisie), le second par Langeron, à Tunis, en septembre 1911.

Ed. Et. Sergent et Senevet ont constaté l'existence de la leishmaniose canine à Alger (2). Senevet a trouvé, au printemps, 3 chiens infectés sur 186, soit 1,6 p. 100 et, en été, 4 chiens infectés sur 45, soit 8,8 p. 100. La leishmaniose canine serait donc plus fréquente en été qu'au printemps.

En 1912, d'août à septembre, Lemaire, Ed. Sergent et Lhéritier ont examiné 205 chiens tués à la fourrière d'Alger; 2 animaux seulement étaient infectés de *Leishmania*, soit, à très peu près, une proportion de 1 p. 100. En 1913, d'avril à juillet, les mêmes observateurs ont examiné 272 chiens provenant également de la fourrière d'Alger sur lesquels 7 ont été trouvés infectés, soit une proportion de 2,57 p. 100 (3). De ces chiffres on ne peut pas conclure à la prédominance au printemps de la leishmaniose canine, parce que l'examen des chiens n'a pas été fait dans les mêmes conditions en 1912 et 1913. En 1912, les auteurs ont porté le diagnostic après examen de frottis de rate et de moelle osseuse, tandis qu'en 1913, ils ont procédé par ensemencement de la moelle osseuse, ce qui constitue un moyen de diagnostic beaucoup plus précis que l'examen histologique de frottis de la rate et de la moelle osseuse.

Critien a constaté que la leishmaniose était commune à Malte chez les chiens, comme chez les enfants; sur 30 chiens examinés, 3 avaient des *Leishmania* dans la rate (4).

Wenyon, qui a recherché à Malte la fréquence de la leishmaniose canine, est arrivé à un chiffre très voisin de celui de

(1) C. NICOLLE, *Soc. de path. exotique*, 10 juin 1914.

(2) Ed. et Et. SERGENT, *Soc. de path. exotique*, 12 octobre 1910. — G. SENEVET, *même Soc.*, 14 février 1912.

(3) G. LEMAIRE, Ed. SERGENT et A. LHÉRITIER, *Soc. de path. exotique*, 8 octobre 1913.

(4) A. CRITIEN, *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1910 et *Ann. of trop. med. a. parasitol.*, avril 1911.

Critien; sur 46 chiens examinés, 6 ont été trouvés infectés (1).

D. Alvarès et Pereira da Silva, sur 300 chiens examinés à Lisbonne, en ont trouvé 8 qui étaient infectés de leishmaniose. Dans une autre série de recherches, P. da Silva a noté, à Lisbonne, 4 chiens infectés, sur 109 examinés, et les *Leishmania* n'ont été recherchées que dans la rate (2).

G. Pittaluga, en Espagne, a observé 2 chiens infectés de leishmaniose aux environs de Tortosa et un troisième chien infecté à Beninar [province d'Almeria (3)].

On sait que de nombreux cas de kala-azar infantile ont été signalés depuis quelques années dans l'Italie méridionale, principalement en Calabre et en Sicile; la leishmaniose canine est enzootique dans les mêmes régions.

R. Jemma, à Palerme, a examiné 227 chiens avec résultat négatif au point de vue de la leishmaniose, mais, aux environs de Palerme, il a constaté à deux reprises l'infection du chien dans les mêmes localités que le kala-azar infantile; un des chiens infectés vivait dans le voisinage immédiat d'un enfant atteint de kala-azar (4).

A Bordonaro, près de Messine, Basile, sur 33 chiens examinés (par ponction du fémur), a trouvé 27 fois des *Leishmania*; il y avait des chiens infectés dans toutes les maisons renfermant des enfants atteints de kala-azar (5).

Si, en Italie, la leishmaniose canine a été signalée dans toutes les régions d'endémicité du kala-azar infantile, il s'en faut qu'il y ait une relation étroite et constante entre les chiffres de fréquence de ces maladies chez le chien et chez l'enfant. A Palerme, Caronia et di Giorgio n'ont trouvé qu'un chien infecté sur 1.005 chiens examinés (6) et, à Rome, sur 60 chiens du dépôt municipal examinés, 16 ont été trouvés infectés (7); or, à Palerme, le kala-azar est endémique, tandis que la région de Rome paraît indemne.

(1) C.-M. WENYON, *Soc. of trop. med. a. hyg.*, jan. er 1914.

(2) D. ALVARÈS, *Med. contemporanea*, 20 mars 1910. — D. ALVARÈS et E. PEREIRA DA SILVA, *même recueil*, 26 mars 1911 et *Arq. do Inst. bact. Camara Pestana*, juin 1914.

(3) G. PITTALUGA, *Pathologica*, 1^{er} mars 1914.

(4) R. JEMMA, *Pathologica*, 1^{er} juin 1910 et 1^{er} août 1912.

(5) C. BASILE, *Rendiconti d. R. Accad. dei Lincei*, 1910, t. XIX, p. 158.

(6) CARONIA et DI GIORGIO, *Pathologica*, 15 avril 1914.

(7) C. BASILE, *op. cit.*

Sur 310 chiens examinés à Marseille par Pringault, 5 ont été trouvés infectés de leishmaniose, soit une proportion de 1,61 p. 100 (1). Jusqu'ici aucun cas de kala-azar infantile n'a été observé dans la région de Marseille.

La leishmaniose canine est commune en Grèce. Sur 589 chiens examinés à Athènes par Cardamatis, 81 étaient parasités, soit 13,75 p. 100 (2). Sur 48 chiens examinés par Lignos dans l'île d'Hydra, 8 étaient infectés de leishmaniose, soit 16,66 p. 100 (3); les recherches de Lignos ont été faites de mai à octobre 1912.

Dschunkowsky et Luhs ont signalé l'existence de la leishmaniose canine en Transcaucasie (4); la maladie ne serait pas rare dans cette région, d'après Marzinowsky (5).

A Tashkent (Turkestan), W.-L. Yakimoff, M^{me} Yakimoff et N.-J. Schokor, sur 647 chiens examinés d'avril à septembre 1913, en ont trouvé 157 qui étaient infectés de leishmaniose, ce qui donne la forte proportion de 24,26 p. 100 (6).

Au Soudan, Bousfield a trouvé dans la rate d'un chien qui vivait dans la même hutte qu'un malade atteint de kala-azar très aigu des éléments parasitaires qui paraissent être des *Leishmania* (7).

Jusqu'ici, la leishmaniose naturelle du chien n'a pas été observée dans les régions où le kala-azar indien est endémique.

EVOLUTION. SYMPTÔMES. — La maladie est tantôt légère et latente, tantôt grave; la durée de son évolution, plus ou moins rapide, est difficile à fixer, attendu que les débuts sont toujours méconnus.

Dans la forme légère ou latente, la maladie ne peut être

(1) E. PRINGAULT, *Soc. de path. exotique*, 10 janvier et 10 juin 1914.

(2) J. CARDAMATIS, *Soc. de path. exotique*, 14 février 1912.

(3) A. LIGNOS, *Soc. de path. exotique*, 12 février 1913.

(4) E. DSCHUNKOWSKY et J. LUHS, *IX^e Congrès internat. de méd. vétér.*, La Haye, septembre 1909.

(5) E.-I. MARZINOWSKY, *Soc. de path. exotique*, 11 décembre 1912.

(6) N. KOHL-YAKIMOFF, W.-L. YAKIMOFF et N.-J. SCHOKHOR, *Soc. de path. exotique*, 11 juin 1913. — W.-L. YAKIMOFF et N.-J. SCHOKHOR, *même Soc.* 11 mars 1914.

(7) L. BOUSFIELD, *Jl. R. Army med. Corps*, 1910 et *Transact. of the Soc. of trop. med. a. hyg.*, avril 1912.

reconnue que par les procédés de recherche des *Leishmania* qui seront indiqués plus loin. (V. DIAGNOSTIC.)

Les manifestations cutanées qu'on observe parfois chez les chiens atteints de leishmaniose, dépendent en général, d'affections parasitaires indépendantes de cette maladie (P. da Silva.)

Dans les formes graves, le symptôme principal, et souvent unique, est fourni par l'amaigrissement. Chez certains animaux, le poil tombe par places ou bien de petites ulcérations se produisent aux muqueuses buccale, conjonctivales ou nasale. A une période avancée de la maladie, les chiens sont apathiques, ils restent couchés et, quand on les oblige à se lever, ils montrent des signes d'une faiblesse surtout apparente dans les pattes postérieures. Chez quelques animaux, il existe une véritable parésie du train postérieur. L'anémie est généralement peu marquée, l'appétit est conservé jusqu'à la période terminale; à ce moment, on observe parfois de la diarrhée. La rate est souvent hypertrophiée, mais cette hypertrophie est très difficile à constater. La mort se produit d'ordinaire en hypothermie. Les *Leishmania* sont généralement assez nombreuses pour que leur recherche soit facile dans la moelle osseuse, dans la rate ou dans le foie (V. DIAGNOSTIC).

Quelques chiens présentent de la kératite avec opacité consécutive d'une cornée ou des deux cornées.

La durée approximative de la maladie varie de trois mois à un an (1).

ANATOMIE PATHOLOGIQUE. — La rate est souvent augmentée de volume, elle est ramollie dans les formes aiguës de l'infection, dure, comme sclérosée, chez les chiens qui sont sacrifiés à une période avancée de la maladie. Le foie peut être aussi augmenté de volume dans les formes aiguës, sclérosé dans les formes chroniques. La moelle osseuse est rouge, diffluent.

C'est dans la moelle osseuse que l'on trouve d'ordinaire les *Leishmania* en plus grand nombre; parmi les viscères les plus

(1) Consulter pour la description de la leishmaniose naturelle du chien : C. BASILE, *R. Accad. dei Lincei*, 20 novembre 1910; W.-L. YAKIMOFF et N. KOHL-YAKIMOFF, *Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 1911; G. LEMAIRE, Ed. SERGENT et A. LHÉRITIER, *Revue méd. d'Alger*, janvier 1914.

atteints, il faut citer en premier lieu la rate, en second lieu le foie. On trouve assez souvent des *Leishmania* dans les ganglions lymphatiques. Les parasites, très nombreux dans la moelle osseuse et dans la rate, chez les chiens atteints d'infections aiguës graves, sont si rares dans les formes légères ou à la période terminale des infections en voie de guérison que leur recherche présente de sérieuses difficultés.

C. Basile a constaté, à l'autopsie de deux chiens atteints de leishmaniose naturelle, la présence de *Leishmania* dans la moelle épinière, ce qui rendrait compte des symptômes spinaux assez fréquents à la dernière période de la maladie (4). Lacava avait noté précédemment l'existence de *Leishmania* dans le liquide cérébro-spinal d'un enfant atteint de kala-azar.

Lemaire, Ed. Sergent et Lhéritier ont signalé l'existence de *Leishmania* dans l'épaisseur de la cornée d'un chien atteint de leishmaniose compliquée de kératite (2).

AGENT PATHOGÈNE. — Les *Leishmania* que l'on trouve chez les chiens infectés naturellement sont identiques, morphologiquement, à celles du kala-azar humain, ce qui me dispense d'en faire la description; comme ces dernières, elles donnent, dans le milieu de Novy simplifié, de belles cultures de Flagellés qu'il est impossible de distinguer, d'après leurs caractères morphologiques, des Flagellés de culture des *Leishmania Donovanii* ou des *L. infantum*. Chez les chiens infectés naturellement, la répartition des parasites est la même que chez les chiens atteints de leishmaniose expérimentale. Dans les deux cas, c'est la moelle osseuse qui est le siège principal et parfois unique des *Leishmania*; par ordre de fréquence des parasites, il faut citer ensuite la rate et le foie.

Les animaux sensibles au virus humain sont également sensibles au virus canin.

Nicolle et Conor ont constaté que le singe était sensible au virus canin comme au virus humain du kala-azar et que les localisations des parasites étaient les mêmes chez les singes inoculés avec l'un ou l'autre de ces virus (3).

(4) C. BASILE, *R. Accad. dei Lincei*, 20 avril 1913.

(2) G. LEMAIRE, ED. SERGENT et A. LHÉRITIER, *Soc. de path. exotique*, 11 mars 1914.

(3) C. NICOLLE et M. CONOR, *Soc. de path. exotique*, 12 juin 1912.

On peut produire, chez la souris blanche, des infections généralisées par l'inoculation intrapéritonéale du virus de la leishmaniose naturelle du chien, comme par l'inoculation du virus humain du kala-azar (1).

Si grandes que soient les ressemblances entre la leishmaniose naturelle du chien et la leishmaniose expérimentale produite par l'inoculation du virus humain, quelques observateurs contestent encore l'identité de ces infections.

Gabbi, Spagnolio et Giugni ont comparé le tableau clinique de la leishmaniose naturelle du chien à celui du kala-azar chez l'homme et ont conclu des dissemblances existant entre ces tableaux à l'existence d'entités morbides distinctes (2); cette comparaison prête à la critique: il est assez naturel en effet que l'homme et le chien ne réagissent pas de la même manière; si les observateurs précités avaient comparé le tableau clinique de la leishmaniose naturelle du chien, non pas au tableau clinique de la maladie chez l'homme, mais à celui de l'infection produite chez le chien par l'inoculation du virus du kala-azar, ils auraient vu que, dans les deux cas, l'évolution et les symptômes de la maladie étaient les mêmes.

Les auteurs italiens objectent, avec plus de raison, qu'il n'y a pas de rapport exact et constant entre la fréquence de la leishmaniose naturelle chez le chien et celle du kala-azar infantile.

Scordo, Giugni et Moldovan ont recherché comment les cultures de la *Leishmania* du chien (infection naturelle) et de la *L. infantum* se comportaient *in vitro* sous l'action du sérum de sujets atteints de kala-azar (3). D'après Scordo, les flagellés des deux espèces de cultures s'agglutinent, s'immobilisent et se désagrègent au bout d'un certain temps, mais ces phénomènes se produisent avec un notable retard dans les cultures de la *Leishmania* de l'infection naturelle du chien. Giugni et Moldovan, plus affirmatifs, concluent que dans des conditions

(1) A. JANNOT, *Soc. de path. exotique*, 10 décembre 1913:

(2) A. SPAGNOLIO et FR. GIUGNI, *Malaria e malattie dei paesi caldi*, 20 août 1914, anno V, p. 297.

(3) F. SCORDO, *Malaria e malattie dei paesi caldi*, 20 août 1914. — G. SPAGNOLIO et FR. GIUGNI, *même recueil*, même numéro.

d'expérience identiques, les deux cultures se comportent d'une manière complètement différente.

Les phénomènes sur lesquels Scordo, Giugni et Moldovan se basent pour distinguer la *Leishmania* de l'infection naturelle du chien de la *Leishmania* du kala-azar infantile sont bien loin d'être assez caractéristiques pour trancher la question. En ce qui me concerne, j'ai cherché plusieurs fois à obtenir des agglutinations dans des cultures de *Leishmania infantum* à l'aide du sérum d'animaux en cours d'infection par cette *Leishmania*, ou après guérison, et les résultats obtenus ont été nuls ou incertains.

Toutes les probabilités paraissent être en faveur de l'identité de la *L. infantum* et de la *Leishmania* de l'infection naturelle du chien; toutefois il n'est pas douteux que la question présente encore des obscurités. Pourquoi le rapport de fréquence de la leishmaniose du chien et de la leishmaniose infantile est-il aussi inconstant? Pourquoi est-il si rare de constater l'existence de chiens infectés de leishmaniose dans les maisons où se trouvent des malades atteints de kala-azar? Enfin si, comme cela paraît probable, le kala-azar indien est de même nature que le kala-azar méditerranéen, comment se fait-il que, dans l'Inde, toutes les recherches faites pour découvrir des cas de leishmaniose naturelle du chien soient demeurées infructueuses? Il est probable qu'il ne sera possible de répondre à ces questions que lorsque nous connaissons le mode de diffusion des leishmanioses.

MODES D'INFECTION. — Dès 1908, Nicolle a émis l'hypothèse que la leishmaniose naturelle du chien et le kala-azar infantile étaient propagés par les puces (1), et quelques faits expérimentaux ont paru confirmer cette opinion.

D'après Basile, la *L. infantum* pourrait évoluer dans le tube digestif de la puce du chien, *Ctenocephalus canis*, et de la puce de l'homme, *Pulex irritans*, et ces deux insectes seraient capables de propager la maladie chez l'homme, comme chez le chien.

Le même observateur a réussi à infecter un jeune chien en le

(1) C. NICOLLE, *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1908, fasc. III, p. 116.

plaçant dans une cage voisine de celle d'un chien fortement infecté de leishmaniose et ayant de nombreuses puces, qui émigrèrent en partie sur le jeune chien. Basile a infecté, d'autre part, une souris en lui inoculant le contenu du tube digestif de puces nourries sur des chiens atteints de leishmaniose (1).

Ed. et Et. SÉRGENT, A. LHÉRITIER et G. LEMAIRE ont cité le fait suivant : une chienne en bonne santé, piquée par de nombreuses puces nourries sur un chien atteint de leishmaniose, s'est infectée ; à l'autopsie, on a constaté l'existence de *Leishmania* dans la rate et dans la moelle osseuse (2).

On peut objecter que la leishmaniose naturelle du chien n'est pas rare dans les régions où ces expériences ont été faites et que les procédés employés par les auteurs précités pour constater l'absence de *Leishmania* chez les chiens soumis aux piqûres de puces, la ponction du foie notamment, sont tout à fait insuffisants. La chienne de Ed. et Et. SÉRGENT, LHÉRITIER et LEMAIRE, essayée par ponction du foie au début de l'expérience, n'a montré, à l'autopsie, aucune *Leishmania* dans le foie, alors qu'il y avait des *Leishmania* dans la rate et dans la moelle osseuse, ce qui prouve que le procédé de diagnostic employé était insuffisant.

Les inoculations, en apparence positives, faites à différents animaux avec le contenu des puces ayant sucé du sang de sujets infectés de leishmaniose ne sont pas non plus probantes ; l'infection des puces par des Flagellés qui n'ont rien à faire avec les *Leishmania* est très fréquente (3) et il résulte des recherches de Laveran et Franchini que ces Flagellés des puces, de la puce du chien en particulier, *Ctenocephalus canis*, peuvent donner lieu, chez certaines espèces animales, à des

(1) C. BASILE, *R. Accad. dei Lincei*, 20 novembre 1910, 8 janvier, 19 février, 19 mars 1911 et 6 avril 1913.

(2) Ed. et Et. SÉRGENT, A. LHÉRITIER et G. LEMAIRE, *Soc. de path. exotique*, 9 octobre 1912.

(3) A. BALFOUR, *Journal of Hygiene*, 1906, p. 1040 et *Second Report of the Wellcome research Laboratories*, Khartoum, 1906, p. 105. — PATTON et STRICKLAND, *Parasitology*, 1908, p. 333. — G. SANGIORGI, *Pathologica*, 15 janvier 1911. — V. MARZOCCHI, *Pathologica*, 1911, p. 256. — A. PORTER, *Parasitology*, octobre 1911. — H.-B. FANTHAM, *Brit. med. Assoc.*, Liverpool, juillet 1912 et *Brit. med. Journal*, 2 novembre 1912. — Ed. CHATTON et DELANOE, *Soc. de Biologie*, 27 juillet 1912. — W. NÖLLER, *Arch. f. Protistenkunde*, 17 mai 1912. — H.-B. FANTHAM et A. PORTER, *Ann. trop. med. a. parasitol.*, 30 décembre 1913. — A. LAVERAN, *Soc. de path. exotique*, 1913, t. VI, p. 113.

infections légères, caractérisées par la présence dans le foie, dans la rate et dans la moelle osseuse, d'éléments parasitaires ayant une grande ressemblance avec les *Leishmania* (1).

D'après Basile, les parasites que l'on trouve dans les puces infectées sur les enfants ou sur les animaux atteints de leishmaniose seraient bien distincts, morphologiquement, des *Herpetomonas* propres aux puces. Cette assertion me paraît très contestable; j'ai trouvé chez des puces infectées naturellement, et n'ayant certainement sucé le sang d'aucun sujet atteint de leishmaniose, des parasites qui avaient tout à fait l'aspect des *Leishmania*.

Massaglia (2), Marshall (3), Pereira da Silva (4), Wenyon (5) ont essayé sans succès d'infecter des chiens à l'aide de puces ayant sucé du sang d'animaux atteints de leishmaniose; les expériences de Wenyon, faites à Malte, dans d'excellentes conditions, sont particulièrement intéressantes. Wenyon avait amené d'Angleterre 4 chiens; 2 de ces chiens furent soumis aux piqûres de nombreuses puces nourries sur un chien infecté de leishmaniose; ces deux chiens moururent d'anémie et on pouvait supposer qu'ils s'étaient contaminés, mais il fut impossible de trouver des *Leishmania* à l'examen des frottis du foie, de la rate ou de la moelle osseuse, et des essais de culture donnèrent des résultats négatifs.

D'après Basile, les conditions de température ont une grande importance dans les expériences de transmission de la leishmaniose par les puces; les températures de 18 à 30 degrés seraient seules favorables au développement des *Leishmania*; au-dessous de 18 degrés, et au-dessus de 30 degrés, les puces ne pourraient pas s'infecter. On s'expliquerait ainsi les résultats négatifs obtenus par quelques observateurs. On se place aussi dans des conditions défavorables à l'expérience quand on nourrit les puces sur des animaux faiblement infectés, ayant des *Leishmania* très rares dans le sang (6).

(1) A. LAVERAN et G. FRANCHINI, *Acad. des Sciences*, 1^{er} septembre et 3 novembre 1913; *Soc. de path. exotique*, 8 juillet 1914.

(2) A. MASSAGLIA, *Pathologica*, 1^{er} juin 1912.

(3) W.-E. MARSHALL, *Jl. R. Army med. Corps*, septembre 1912.

(4) P. DA SILVA, *Arg. do Inst. bacter. Camara Pestana*, 1913, t. VI, fasc. 2.

(5) C.-M. WENYON, *Soc. of trop. med. a. hyg.*, janvier 1914.

(6) C. BASILE, *R. Accad. dei Lincei*, 5 et 19 avril 1914.

On conçoit que les expériences sur le rôle des puces dans la transmission de la leishmaniose soient difficiles à réaliser et que, si même ces insectes ont le rôle qui leur a été attribué par Nicolle et Basile, les résultats soient souvent négatifs; les *Leishmania* sont, en effet, toujours rares ou très rares dans le sang des chiens infectés et, d'autre part, la sensibilité des chiens au virus humain du kala-azar et même au virus canin n'est pas très grande. On verra dans le chapitre suivant que, pour infecter des chiens avec la *L. infantum*, il faut leur inoculer de très fortes doses de virus. Avec le virus de la leishmaniose canine, on réussit facilement un ou deux passages par chiens, mais il est difficile de pousser au delà du troisième passage (1).

Les recherches de Franchini tendent à démontrer que les Culicides jouent un rôle important dans la transmission de la *L. infantum* (2). D'après cet observateur, on réussirait assez facilement à infecter divers culicides et, en particulier l'*Anopheles maculipennis*, en leur faisant sucer soit des cultures de *Leishmania*, soit le produit de la ponction de la rate de sujets infectés de kala-azar. Ici, comme pour les puces, on se heurte malheureusement à l'objection fournie par l'existence fréquente, dans le tube digestif des moustiques, de protozoaires ayant une grande ressemblance avec les *Leishmania*. D'autre part, il ne suffirait pas de démontrer que les *Leishmania* peuvent vivre et se développer dans le tube digestif de certains moustiques, il faudrait prouver que les moustiques ainsi infectés sont susceptibles de transmettre la maladie, ce qui n'a pas été fait jusqu'ici.

Patton qui, en nourrissant des punaises (*Cimex rotundatus* ou *C. lectularius*) sur des sujets ayant des *Leishmania Donovanii* nombreuses dans le sang, a réussi à observer le développement complet des parasites du kala-azar indien dans le tube digestif des punaises, a conclu de ses expériences que les punaises sont les agents de propagation du kala-azar indien et probablement aussi du kala-azar méditerranéen (3).

(1) C. NICOLLE et MARTHE CONOR, *Soc. de path. exotique*, 10 juin 1914.

(2) G. FRANCHINI, *Malaria e malattie dei paesi caldi*, novembre 1911; *Ann. of trop. med. a. parasit.*, mai 1912; *Riforma med.*, 7 septembre et 7 décembre 1912.

(3) W.-S. PATTON, *Scientif. Mem. by Offic. of the med. a. sanit. Dep. of the Gov. of India*, 1912. N. S., n° 53.

On trouve parfois (rarement il est vrai), chez les punaises, comme chez les puces et les moustiques, des Flagellés qui peuvent être confondus avec des formes d'évolution des *Leishmania* (1); afin de se mettre à l'abri de cette cause d'erreur, Patton s'est servi, pour ses expériences, de punaises issues d'œufs, au laboratoire, qui ont été nourries à l'état de nymphes sur un malade atteint de kala-azar ayant des *Leishmania* nombreuses dans le sang; c'est dans les nymphes de *C. rotundatus* et de *C. lectularius* ainsi infectées qu'il a pu suivre l'évolution des parasites qu'il divise en stades préflagellé, flagellé et post-flagellé.

Les observations de Patton sont très intéressantes, mais il reste à compléter la démonstration qu'il a commencée en montrant que les punaises parasitées sont susceptibles de transmettre l'infection, ce qui n'a pas été fait jusqu'ici.

Franchini a essayé sans succès d'infecter des *Cimex lectularius* avec des cultures de la *L. infantum* (2).

On voit que, malgré les nombreuses recherches entreprises pour découvrir le mode de propagation de la leishmaniose canine ou de la leishmaniose humaine, la question est encore très obscure.

DIAGNOSTIC. PRONOSTIC. — Comme on l'a vu plus haut, les symptômes de la leishmaniose canine sont rares et peu caractéristiques, si même ils ne font pas complètement défaut. L'amaigrissement, qui est le symptôme le plus constant, s'observe dans un grand nombre de maladies. Le seul moyen de diagnostic consiste à rechercher les *Leishmania* et il faut bien savoir que la découverte de ces parasites est difficile quand ils n'existent qu'en très petit nombre, comme cela arrive dans les formes légères ou chez les animaux en voie de guérison. Même à l'autopsie, alors qu'on peut multiplier les examens histologiques de frottis de la moelle des os, de la rate et du foie, on n'arrive pas toujours à déceler ainsi l'existence des *Leishmania*. Laveran et Pettit ont montré qu'il y avait lieu

(1) R.-B. ARCHIBALD, *Fourth Rep. Wellcome trop. research Labor.*, Khartoum, 1911, t. A, p. 179.

(2) G. FRANCHINI, *Malaria e malattia dei paesi caldi*, juin 1911 et *Soc. de path. exotique*, 11 décembre 1912.

de recourir dans ces cas à l'ensemencement dans le milieu de Novy simplifié qui donne souvent des résultats positifs, alors que la recherche directe des parasites en avait donné de négatifs (1). On a vu plus haut que c'est la moelle osseuse qui contient, en général, le plus grand nombre de parasites chez le chien, c'est donc à l'ensemencement de ce tissu qu'il faut avoir recours; il est d'ailleurs plus facile d'ensemencer une parcelle de moelle osseuse qu'une parcelle de rate. Après avoir enlevé un fémur, on le scie et on flambe une des surfaces de section, on plonge dans la moelle, généralement ramollie, un fil de platine un peu rigide, recourbé en anse à son extrémité, après l'avoir flambé; on charge sur l'anse une parcelle de la moelle que l'on dépose dans l'exsudat liquide d'un tube de culture; on peut préparer ainsi plusieurs tubes; 2 à 3 suffisent en général. Au bout d'un temps qui varie avec la richesse en *Leishmania* du tissuensemencé on voit apparaître les flagellés caractéristiques. Quand les *Leishmania* sont extrêmement rares, l'apparition des flagellés peut être tardive; il faut conserver les tubes de culture pendant un mois au moins. Les tubes doivent être placés dans une étuve à température constante, réglée à 22 degrés.

La recherche des *Leishmania* est naturellement plus difficile chez le chien vivant que chez le chien mort. L'examen direct des tissus, suffisant dans les cas d'infection forte, doit être complété dans les cas d'infection faible, avec examens histologiques négatifs, par l'ensemencement du sang ou de lambeaux des tissus.

Nicolle et Conor ont préconisé la ponction du foie pour le diagnostic de la leishmaniose du chien, la ponction de la rate n'étant pas possible chez cet animal; le siège d'élection est le 10^e espace intercostal droit à 1 ou 2 travers de doigt des apophyses épineuses (2).

La ponction du foie ne permet de déceler l'existence des *Leishmania* que lorsqu'il s'agit d'infections graves; dans beaucoup de cas ce procédé de diagnostic est tout à fait insuffisant.

L'examen de la moelle des os qui, comme on l'a vu plus

(1) A. LAVERAN et A. PETTIT, *Soc. de path. exotique*, 8 décembre 1909.

(2) C. NICOLLE et A. CONOR, *Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 1910, fasc. III, p. 109.

haut, est le siège d'élection des *Leishmania* chez le chien, constitue un procédé de diagnostic plus exact que la ponction du foie surtout si, en outre de l'examen histologique, on fait des ensemencements; il est facile de trépaner le fémur à sa face externe.

Dans les infections fortes, on constate assez facilement par l'examen histologique la présence des *Leishmania* dans le sang; il est indiqué d'examiner, dans les frottis de sang desséché, la partie terminale qui renferme des leucocytes en grand nombre, on peut aussi faire des préparations un peu épaisses que l'on colore au Romanowsky sans fixer.

Novy a conseillé de recueillir 10 cent. cubes environ de sang chez le chien suspect et d'ensemencer avec ce sang une vingtaine de tubes de culture (1). J'ai réussi à déceler plusieurs fois la leishmaniose du chien en ensemençant 2 à 3 tubes seulement, chacun avec une dizaine de gouttes de sang; il est très facile, chez le chien, de prendre aseptiquement du sang dans les saphènes externes.

Il est probable que la leishmaniose naturelle du chien se termine souvent par guérison comme la leishmaniose expérimentale dont il sera question dans un autre chapitre.

PROPHYLAXIE. — La prophylaxie de la leishmaniose canine est d'un grand intérêt attendu que, dans l'état actuel de la science, il y a des probabilités pour que la maladie puisse être transmise du chien à l'enfant.

Nous avons vu que le diagnostic ne pouvait être fait que par la recherche des *Leishmania* chez le chien vivant ou mort; il est à désirer que les vétérinaires se familiarisent avec les procédés d'examen qui ont été exposés plus haut, qu'ils sachent reconnaître, dans les préparations histologiques, les *Leishmania* dont l'aspect est d'ailleurs si caractéristique, et qu'ils puissent procéder à la recherche de ces parasites par la méthode de l'ensemencement dans le milieu de Novy simplifié.

Les chiens reconnus atteints de leishmaniose seront abattus ainsi que les chiens errants.

(1) F.-G. Novy, *Soc. de path. exotique*, 21 juillet 1909.

L'importation des chiens provenant de régions contaminées sera prohibée.

Dans les régions menacées, on procédera à des examens méthodiques des chiens abattus en fourrière, afin de connaître la fréquence de la maladie, et de se rendre compte des progrès qu'elle pourrait faire.

On ne connaît pas de traitement efficace de la leishmaniose canine.

(A suivre.)

RECHERCHES SUR LE PROTEUS VULGARIS

par ALBERT BERTHELOT.

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les recherches que je vais exposer portent toutes sur le *Proteus vulgaris*, mais elles forment cependant deux groupes bien distincts. Les unes, en effet, ont eu simplement pour objet l'étude critique d'un petit nombre de caractères différentiels de ce microbe : coloration par la méthode de Gram, action sur les hydrates de carbone, production de phénol et d'indol, tandis que les autres avaient principalement pour but la détermination des propriétés pathogènes d'un *Proteus* d'origine bien déterminée.

Grâce à la bienveillance de M. Metchnikoff et à l'amabilité de quelques-uns de mes collègues j'ai pu disposer, pour mes recherches, de soixante et une races de *Proteus*, de provenances très diverses ainsi que l'on peut s'en rendre compte par le tableau ci-dessous :

NUMÉROS	ÉCHANTILLONS ISOLÉS	PROVENANCE
1 à 24 35 à 40 45 à 57	Par M. Metchnikoff . . .	Diarrhées infantiles (Paris).
41	— M. Metchnikoff . . .	Matières d'une adulte atteinte de troubles intestinaux chroniques.
25 à 34	— M. D.-M. Bertrand .	Diarrhées infantiles (Londres).
43	— M. Fosse	Otite.
44	— M. H. Tissier	Viande en putréfaction.
58 et 59	— M. M. Cohendy . . .	Vomiques.
60	— M. D.-M. Bertrand .	Otite.
61	— M. D.-M. Bertrand .	Ozène.
42	Identifié par M. Legroux.	Collection de l'Institut Pasteur. Origine inconnue. Cultivé depuis longtemps sur gélose ordinaire.

Malgré cette diversité d'origine tous présentaient à un degré variable (1) les propriétés suivantes : mobilité, liquéfaction de la gélatine, coagulation du lait suivie de la digestion du coagulum, production d'ammoniaque et d'hydrogène sulfuré ; toutes possédaient donc un ensemble de caractères qu'accuse toujours le microbe décrit par Hauser (2) sous le nom de *Proteus vulgaris* et étudié dans certains ouvrages récents sous celui de *Bacillus vulgaris*. Au point de vue des propriétés sur lesquelles l'entente des bactériologistes n'est pas encore faite (fonction indologène, action sur les sucres) ces races semblaient différer quelque peu entre elles ; mais, ainsi qu'on le verra plus loin, j'ai pu établir qu'il s'agissait de différences apparentes et qu'elles appartenaient bien toutes à une seule et même espèce.

I. — LE PROTEUS ET LA MÉTHODE DE GRAM.

Tous les bactériologistes ne sont pas d'accord sur la manière dont se comporte ce microbe quand on le traite par la méthode de Gram. Les uns, et ce sont les plus nombreux et les plus anciens, le considèrent comme prenant le Gram ; les autres affirment qu'il se décolore toujours après l'action de la solution iodo-iodurée.

Bien des auteurs ont dû être frappés de cette divergence d'opinions, mais cependant il en est peu qui aient tenté de faire cesser l'indécision qui persistait sur ce point important. C'est Léon Feltz (3) qui le premier, en 1900, aborda sérieusement ce sujet ; ses essais portèrent sur quatre *Proteus* d'origines diverses qu'il étudia très complètement à différents points de vue.

A l'égard des affinités colorantes, après avoir répété maintes fois ses expériences dans des conditions variées, il en arriva aux conclusions suivantes : « Le *Proteus vulgaris* prend toujours le Gram, mais il faut pour cela opérer sur des cultures jeunes,ensemencées sur des milieux où il pousse bien ; ces conditions

(1) Certains échantillons récemment isolés manifestaient, à la température du laboratoire, un pouvoir protéolytique très faible, mais celui-ci ne tardait pas à s'accroître à la suite des passages en milieux usuels.

(2) GUSTAV HAUSER, *Ueber Fäulnisbakterien; ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze*, 1885, F. C. W. Vogel, Leipzig.

(3) LÉON FELTZ, *Le Proteus vulgaris* Hauser ; *Thèse de Pharmacie*, Paris, 1900.

sont très importantes pour arriver à de bons résultats. » Il fit également remarquer qu'il est indispensable de toujours employer une solution de violet de gentiane faite, au moment du besoin, avec de l'eau anilinée récente et que, si l'on veut utiliser le violet phéniqué, il est de même nécessaire qu'il soit fraîchement préparé.

Étant donné le soin que Feltz avait apporté à ses recherches, il semble que ses résultats auraient dû résoudre définitivement la question qui nous occupe ; pourtant il n'en est rien et, parmi les nombreux auteurs qui ont étudié le *Proteus* après lui, bien peu ont confirmé ses conclusions si catégoriques.

Je ne passerai pas en revue tous les travaux qui, depuis 1900, ont eu ce microbe pour objet et je me contenterai d'en citer trois, relativement récents. Ils sont d'ailleurs particulièrement suggestifs parce qu'ils ont été publiés presque en même temps, qu'ils ont porté sur des races isolées dans des lieux fort éloignés les uns des autres et qu'ils classent tous les trois le *Proteus* parmi les espèces ne prenant pas le Gram.

Dans le premier de ces mémoires, en juillet 1911, C. A. Herter et C. Ten Broeck (1), de New-York, indiquèrent, en effet, que les deux *Proteus* qu'ils ont examinés se décoloraient après l'action de l'iode. Dans le second, paru trois mois plus tard, E. Glaser et J. Hacla (2), de Vienne, dirent avoir étudié 16 *Proteus* d'origines très diverses et qui étaient tous Gram-négatifs. Enfin, en novembre de la même année, Ch. Cantù (3) publia les résultats de recherches entreprises à l'Institut Pasteur sur plus de 180 *Proteus* isolés par lui, dans les conditions les plus variées, et qui tous se décoloraient après traitement par la solution iodée.

Si ces divers auteurs avaient précisé la technique de leurs essais de coloration, peut-être aurais-je trouvé l'explication du désaccord qui existe entre leurs affirmations et celles de Feltz ; mais, comme aucun d'eux n'a donné les détails nécessaires, j'ai tenu à me faire une opinion personnelle en utilisant les

(1) C. A. HERTER et CARL TEN BROECK, A biochemical study of *Proteus vulgaris* Hauser. *Journal of biological Chemistry*, t. IX, juillet 1911, p. 491.

(2) E. GLASER et JOSEF HACLA, Beiträge zur Kenntnis der Proteusbakterien... *Zeitschr. f. Immunitätsforschung*, I Original, t. XI, 14 okt. 1911, p. 310-355.

(3) CH. CANTÙ, Le *Bacillus proteus*, sa distribution dans la nature. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, novembre 1911, p. 852.

61 *Proteus* que j'avais à ma disposition. Pour chacun de ces échantillons d'origines si diverses, j'ai fait plusieurs séries d'essais en employant des cultures en eau peptonée ou sur gélose ordinaire. L'eau peptonée était une solution à 20 p. 1000 de peptone pancréatique Defresne; la gélose était préparée avec un mélange à parties égales de bouillon de viande non peptoné et de peptone Martin.

Les préparations étaient faites avec des cultures ayant 7, 24 ou 48 heures de séjour à 37 degrés et établies en six exemplaires pour chaque série. Après dessiccation spontanée, deux d'entre elles étaient fixées par la chaleur à la manière ordinaire; deux autres étaient fixées par immersion dans une solution aqueuse saturée de sublimé, contenant 5 p. 1000 d'acide acétique, lavées à l'alcool et séchées à 37 degrés; enfin les deux dernières étaient arrosées avec un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther que je laissais s'évaporer sans faire intervenir la chaleur. Ces préparations diversement fixées étaient traitées, les unes suivant l'ancienne technique — violet de gentiane aniliné fraîchement préparé, solution iodo-iodurée à 1 p. 300 d'iode, alcool absolu — les autres par la méthode généralement employée aujourd'hui — violet de gentiane phéniqué, solution iodo-iodurée au 1/300, décoloration par le mélange de Nicolle : alcool absolu 5 volumes, acétone, 1 volume. Toutes étaient alors immergées quelques instants dans la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10 pour recolorer les éléments microbiens devenus incolores.

De plus, je n'ai jamais employé de liqueur iodo-iodurée vieille de plus de quinze jours et j'ai toujours pris soin de faire une décoloration aussi ménagée que possible. Chaque fois que j'ai utilisé l'alcool-acétone, j'ai suivi scrupuleusement les indications données par MM. Nicolle et Remlinger dans leur *Précis de Technique Microbiologique*. Je me suis donc placé dans des conditions très variées, mais, malgré cela, parmi les nombreuses races de *Proteus* que j'ai examinées, je n'en ai pas trouvé une seule qui ait pris le Gram.

Cependant je n'ai pas voulu me contenter de ce résultat et j'ai fait encore quelques essais en utilisant des milieux qui me semblaient capables d'influencer quelque peu les affinités colorantes des *Proteus* cultivés sur eux. Des cultures sur lait et sur deux milieux contenant de l'oléate de Na m'ont permis d'observer, dans des préparations traitées par l'ancienne technique, des éléments plus ou moins nombreux encore colorés en violet avec une proportion variable de microbes d'aspect granuleux; mais les *Proteus* provenant des mêmes cultures se sont toujours

complètement décolorés lorsque je les ai soumis à l'action du violet phéniqué et de l'alcool acétoné (1).

Dans certaines conditions le *Proteus* peut donc acquérir transitoirement la propriété de retenir quelque peu la matière colorante après l'action de l'iode, mais ce fait est sans grande importance en raison des circonstances exceptionnelles dans lesquelles il se produit. Il est bon de le noter cependant, car il prouve une fois de plus la réelle efficacité de l'alcool acétoné et montre bien qu'en adoptant exclusivement ce décolorant on se garantit contre les erreurs qui pourraient provenir des modifications que certains milieux apportent aux affinités colorantes des microbes.

Enfin, il est un dernier point qu'il m'a fallu élucider, c'est celui qui résulte de l'imprécision dans laquelle Feltz a laissé ses lecteurs quant à la nature du décolorant qu'il a utilisé. Il dit simplement qu'il a toujours fait le « Gram-Weigert » en colorant avec du violet de gentiane aniliné, mais il ne parle pas des opérations consécutives; or, si l'on se rapporte aux ouvrages de technique, comme ceux de Besson (2) ou de Rudolf Abel (3), on voit que la méthode de Gram modifiée par Weigert comporte, avec l'emploi du violet aniliné, une décoloration par l'huile d'aniline pure. Il me fallait donc rechercher si ce procédé appliqué intégralement ne me donnerait pas des résultats différents de ceux que j'ai utilisés.

C'est ce que j'ai fait pour quelques *Proteus* pris au hasard parmi mes soixante et une races. Je les ai utilisés en cultures de 18 heures et je les ai traités suivant Weigert, avec des réactifs fraîchement préparés; malgré cela j'ai constaté qu'ils se comportaient tous de la même façon qu'avec l'alcool absolu et l'alcool-acétone.

En résumé, il résulte de mes recherches que le *Proteus vulgaris* Hauser ne prend pas le Gram, lorsqu'il provient de cultures en milieux usuels et qu'il est traité par la méthode de Gram-Nicolle. La diversité des races que j'ai étudiées ainsi que la multiplicité de mes essais me donnent,

(1) A. BERTHELOT, Recherches sur quelques caractères du *Proteus vulgaris*; Thèse de Médecine, Paris, 1913, p. 8.

(2) A. BESSON, *Technique microbiologique et sérothérapique*, 5^e éd., Paris, 1911.

(3) R. ABEL, *Bakteriologisches Taschenbuch*, 10^e éd., Würzburg, 1906, p. 46.

il me semble, le droit de conclure d'une façon aussi formelle.

II. — ACTION DU PROTEUS SUR LES HYDRATES DE CARBONE.

Bien que le mode d'action sur les sucres constitue un des meilleurs caractères différentiels des espèces microbiennes, de nombreux ouvrages classiques sont muets sur ce point en ce qui concerne le *Proteus vulgaris*. Cette omission est d'autant plus regrettable qu'il s'agit d'un microbe très répandu dans la nature, tantôt saprophyte, tantôt pathogène et pouvant peut-être donner lieu à des races très voisines, ne se distinguant que par quelques caractères biochimiques.

A vrai dire, la négligence des auteurs de ces ouvrages est peut-être voulue et elle a sans doute pour raison l'incertitude dans laquelle nous laissent les travaux des bactériologistes qui ont étudié les propriétés saccharolytiques du *Proteus*.

En effet, parmi ceux-ci, les uns comme Leiborius (1), Gaillard (2), Théobald Smith (3), Herter et Ten Broeck (4), sont d'accord pour affirmer que ce microbe, quelle que soit son origine, attaque toujours le glucose et le saccharose, mais laisse intact le lactose, tandis que d'autres comme Cantù (5) ont une opinion un peu différente.

Pour ce dernier « les sucres sont attaqués par tous les *Proteus*. Avec le lactose seulement, l'attaque n'est pas constante avec toutes les races et avec un même *Proteus* ».

« Les races isolées des viandes et, en général, des substances animales pourries, attaquent les sucres avec une violence qu'on ne retrouve pas dans les cultures de *Proteus* isolées des végétaux : cette différence est vraie des premières cultures ; elle s'efface quand les *Proteus* ont été réensemencés plusieurs fois et s'éloignent pour ainsi dire des conditions naturelles. »

Il est assez difficile de se faire une idée de la valeur respec-

(1) LEIBORIUS, in *die Mikroorganismen* de Flügge, 1896.

(2) GAILLARD, *Contribution à l'étude chimique du Groupe Proteus*, Thèse de Médecine, Paris, 1897.

(3) THEOBALD SMITH, Modifications temporary and permanent of the physiological characters of bacteria in mixed cultures. *Trans. Ass. of Amer. Phys.*, IX, 1894, p. 567-599.

(4) HERTER et TEN BROECK, *loc. cit.*

(5) CH. CANTU, *loc. cit.*

tive des conclusions de ces divers auteurs, car elles résultent de recherches faites dans des conditions pas trop dissimilaires. C'est ainsi que Gaillard et Herter ont étudié un très petit nombre de races, alors que Cantù a examiné 181 *Proteus* d'origines extrêmement variées. D'autre part, les auteurs que je viens de citer ne précisent guère, dans leurs mémoires, la composition des milieux qu'ils ont utilisés et ne donnent que fort peu de détails sur la technique qu'ils ont suivie.

Comme j'avais la chance de disposer d'un grand nombre de *Proteus*, j'ai tenu à étudier, à mon tour, l'action de ce microbe sur les hydrates de carbone, non seulement dans le but de préciser quelque peu la valeur d'un caractère important, mais aussi pour être en mesure de mieux comparer les échantillons isolés des diarrhées infantiles avec ceux qui provenaient d'autres origines.

Afin de pouvoir examiner toutes les races que je possédais j'ai dû m'en tenir, comme Cantù, à une méthode de recherches simple et d'application rapide; je me suis efforcé toutefois d'éviter les causes d'erreurs dont il ne semble pas s'être inquiété. Il est regrettable que le nombre d'essais à entreprendre m'ait forcé d'utiliser des procédés purement qualitatifs; mais, fort heureusement, l'infériorité des résultats que ceux-ci m'ont donnés est largement compensée, il me semble, par la grande diversité d'origine des *Proteus* que j'ai étudiés.

Comme milieu de culture j'ai utilisé la solution suivante :

Eau	1.000
Peptone pancréatique Defresne sèche, en paillettes	20

A l'aide de microbes dont je connaissais parfaitement les propriétés biochimiques je m'étais assuré au préalable que l'échantillon de peptone qui devait me servir pour toutes mes expériences ne renfermait pas de substances hydrocarbonées pouvant donner lieu à la production d'acides. Pour neutraliser l'eau peptonée je l'additionnais d'un excès de carbonate de calcium pur précipité et je la portais à l'ébullition pendant quelques minutes; je laissais le carbonate se déposer et le décantais sur un filtre. Le liquide filtré, neutre au tournesol et à peine coloré, était alors réparti dans des tubes à essais, dans lesquels on en versait uniformément 10 cent. cubes, puis stérilisé 20 minutes à 120 degrés.

D'autre part, je préparais des solutions concentrées des diverses substances parfaitement pures sur lesquelles je voulais faire agir le *Proteus*, solutions qui étaient stérilisées soit à 120 degrés, soit à froid (lévulose) par filtration sur bougie Chamberland. Pour chaque expérience, j'ajoutais aseptiquement

dans une série de tubes d'eau peptonée un volume de solution sucrée calculé de telle façon que le milieu de culture contint environ 3 p. 100 de l'hydrate de carbone considéré; je plaçais alors tous ces tubes à l'étuve à 37 degrés. Vingt-quatre heures après je m'assurais qu'aucun d'eux n'avait cultivé et je pratiquais l'ensemencement avec une race de *Proteus* provenant d'une culture de 24 heures sur gélose ordinaire. Les milieux sucrés ainsi ensemencés étaient mis à 37 degrés en même temps qu'un nombre égal de tubes d'eau peptonée ensemencés avec les mêmes *Proteus*.

Après un temps convenable de séjour à l'étuve, je versais dans tous les tubes le même volume d'une teinture de tournesol sensible et je notais la réaction présentée par les diverses cultures en eau peptonée et en milieu sucré.

Mes essais ont porté sur le glucose, le galactose, le lévulose, le maltose, le saccharose, le lactose et la mannite; mais, comme le *Proteus* est avant tout un fort producteur d'ammoniaque, je ne me suis pas contenté d'un seul essai et j'ai examiné successivement des cultures de deux, cinq, dix et quinze jours. Voici les résultats que j'ai obtenus :

Avec le glucose et le galactose toutes les cultures de cinq, dix et quinze jours étaient acides, tandis qu'elles étaient toutes alcalines avec le lactose et la mannite. Je dois dire cependant qu'un certain nombre de cultures de deux jours sur glucose ou galactose étaient neutres, mais le cinquième jour elles étaient toutes devenues acides. Avec le saccharose, au bout de deux jours, certaines cultures accusaient une réaction acide, tandis que d'autres étaient neutres ou faiblement alcalines; les cultures de cinq jours étaient presque toutes acides, mais quelques-unes étaient neutres; enfin les cultures de dix et quinze jours étaient nettement acides.

Les cultures sur lévulose et maltose se comportaient, au début, à peu près comme celles sur saccharose; les unes étaient acides, les autres neutres ou alcalines: mais le nombre de ces dernières ne diminuait pas, même au bout de 10 ou 15 jours.

De l'ensemble de ces constatations il faut donc retenir que toutes les races de *Proteus vulgaris*, quelle que soit leur origine (1), acidifient au bout de dix jours à 37 degrés les milieux renfermant du glucose, du galactose ou du saccharose comme

(1) A ce propos je dois faire observer que, pour éviter autant que possible l'influence de toute variation individuelle, je n'ai utilisé pour mes essais que des *Proteus* isolés depuis au moins deux mois et ayant subi de nombreux passages sur les milieux usuels.

unique aliment hydrocarboné, mais laissent neutres ou alcalins ceux qui contiennent du lactose ou de la mannite.

D'autre part, il est important de remarquer que la grande variabilité des pouvoirs alcaligène et acidogène impose de ne tenir compte que des changements de réaction constatés sur des cultures assez âgées. Pour certains *Proteus* en effet, la production d'ammoniaque est extrêmement précoce et intense, alors que la formation d'acides aux dépens des hydrates de carbone est assez lente; on comprend facilement que, dans ces conditions, une observation trop hâtive donnerait un résultat inexact.

Ainsi qu'on peut s'en rendre compte par les faits rapportés plus haut, il suffit généralement, pour éliminer cette cause d'erreur, de n'examiner les cultures qu'au bout de 10 jours.

Pour ce qui concerne le lévulose et le maltose, si l'on avait affaire à une autre espèce qu'au *Proteus*, on pourrait conclure à l'existence de deux sortes de races caractérisées par leur différence d'action sur ces deux sucres. Mais avec un microbe comme celui qui nous occupe, il serait singulièrement imprudent d'adopter de telles conclusions; l'exemple du saccharose est là pour montrer que, dans des essais de cette sorte, basés simplement sur l'observation de la réaction finale, il ne faut pas oublier que celle-ci résulte du balancement des deux actions principales qui se manifestent simultanément dans les cultures : 1° attaque de l'aliment azoté avec formation d'ammoniaque; 2° attaque éventuelle de l'aliment hydrocarboné avec formation d'acides.

Tous les *Proteus* donnent peut-être des acides aux dépens du lévulose ou du maltose et il est possible que la diversité des résultats que j'ai obtenus à cet égard tiennent simplement à des différences d'intensité du pouvoir alcaligène et de l'action saccharolytique des diverses races.

On pourra facilement m'objecter que je n'aurais pas dû laisser persister un tel doute sur un point aussi important. A cela je répondrai qu'il m'était pratiquement impossible d'examiner l'action de 61 *Proteus* sur sept substances avec des méthodes comportant des déterminations quantitatives.

Les résultats que m'ont donnés mes essais avec le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose et la mannite sont assez constants, il me semble, pour aider à l'identification du *Proteus*

culgaris, d'autant mieux qu'ils confirment pour le glucose, le saccharose et le lactose les constatations des auteurs qui ont étudié quelques races avec des méthodes plus précises. Toutefois, ces résultats ayant été obtenus à l'aide d'un procédé purement qualitatif, je les considère simplement comme des renseignements utiles et je leur refuse toute valeur intrinsèque permettant de les utiliser à la distinction éventuelle de plusieurs races dans l'espèce créée par Hauser. A ce point de vue, seuls des dosages pourront fournir les données nécessaires.

III. — LE PROTEUS CONSIDÉRÉ COMME PRODUCTEUR DE PHÉNOL ET D'INDOL.

A. — Recherche du phénol et du p. crésol.

En 1890, Lewandowsky (1) publia que les cultures de *Proteus vulgaris* en bouillon de viande contiennent à la fois du phénol et de l'indol. La plupart des auteurs qui étudièrent ce microbe après lui s'inquiétèrent peu du premier de ces corps et s'intéressèrent surtout au second, qu'ils considéraient comme beaucoup plus facile à déceler. Toutefois Tissier et Martelly (2), en 1902, puis Dobrowolsky (3), en 1908, examinèrent à nouveau le *Proteus* au point de vue de la production de phénol. Les deux premiers auteurs étudièrent un *Proteus vulgaris* isolé d'une putréfaction de viande et ils confirmèrent les résultats de Lewandowsky.

Dobrowolsky utilisa pour ses recherches deux races dont il ne précise pas l'origine et qu'il cultiva sur bouillon additionné de 20 p. 1000 de peptone et d'un excès de carbonate de calcium. Il analysa ses cultures au bout de 48 heures et, dans le distillat qu'elles lui fournirent, il trouva seulement des traces de phénol. Des dosages exécutés avec des cultures de 10 jours lui indiquèrent la présence de moins de 1 milligramme de phénol *par litre* pour l'un des échantillons, et de 3 milligrammes pour

(1) LEWANDOWSKY, Ueber Indol und Phenolbildung durch Bakterien. *Deutsche med. Wochenschrift*, 1890, n° 51, p. 1186.

(2) H. TISSIER et MARTELLY, Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, p. 865.

(3) DOBROWOLSKY, Des microbes producteurs de phénol. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1910, n° 7, p. 595.

l'autre. Il résulte donc des travaux de cet auteur que la production de phénol par le *Proteus vulgaris* est pratiquement sans importance.

Plus récemment Herter et Ten Broeck (1) recherchèrent aussi le phénol dans les cultures de deux races de *Proteus vulgaris*, mais ils n'en trouvèrent point, pas plus dans celles en bouillon peptoné que dans d'autres sur bouillon additionné de 0,2 p. 1.000 de tyrosine.

Enfin, pour ma part, je viens d'obtenir des résultats qui concordent absolument avec ceux de ces deux derniers auteurs. Dans un premier essai sur bouillon de viande peptoné additionné de CO_2Ca , aucun de mes *Proteus* ne m'a donné de phénol ; mais je ne m'en suis pas tenu là, car j'ai voulu, comme Herter, me placer dans de meilleures conditions de culture.

Ne pouvant naturellement effectuer ces nouvelles recherches sur 61 échantillons, j'ai pris au hasard, parmi eux, 5 *Proteus* de diarrhées infantiles (Paris et Londres), et 5 autres d'origines diverses (putréfaction, otites, vomique, collection de l'Institut Pasteur). Je les aiensemencés dans une solution d'une peptone pancréatique riche en tyrosine libre et dans un liquide nutritif chimiquement défini contenant des acides aminés et notamment une forte proportion de tyrosine (2) ; avec aucun de ces deux milieux, je n'ai pu déceler trace de phénol ou de crésol dans le distillat de cultures âgées de 4, 8 et 15 jours.

En somme, dans les conditions variées où je me suis placé, le *Proteus vulgaris* Hauser n'est pas un producteur de phénol.

B. — Étude de la fonction indologène.

Ainsi que je le disais au début de ce chapitre, les bactériologistes qui ont étudié le *Proteus vulgaris* ont généralement négligé la recherche du phénol dans les cultures de ce microbe. Par contre, toute leur attention s'est portée sur l'indol et, depuis Lewandowsky, ils ont toujours considéré la faculté de produire cette substance comme l'un des plus importants caractères du

(1) HERTER et TEN BROECK, *loc. cit.*

(2) A. BERTHELOT, Recherches sur quelques caractères du *Proteus vulgaris*, *loc. cit.*, p. 16-17.

microbe de Hauser. En 1900, Feltz (1) étudia même assez complètement ce point de la biochimie du *Proteus*. Il eut l'heureuse idée de tenir compte des indications de Grimbert (2) sur la variabilité de composition des peptones et il montra qu'une même race de *Proteus* peut produire de l'indol aux dépens de certaines de ces préparations et ne pas en donner avec d'autres. Ses recherches, qui portèrent sur 4 échantillons, furent donc faites dans de meilleures conditions que celles de ses devanciers; elles aboutirent à cette conclusion que le *Proteus vulgaris* se comporte toujours en producteur d'indol lorsqu'on le cultive dans un milieu préparé avec une peptone convenablement choisie.

Deux ans plus tard, Tissier et Martelly examinèrent un *Proteus* isolé de viande en putréfaction; ils trouvèrent qu'il produisait de l'indol même dans les cultures sur bouillie de viande.

La constance du caractère biochimique qui nous occupe semblait assez bien établie lorsqu'en 1906, F. A. Steensma (3) remarqua que le distillat des cultures de certaines races de *Proteus* ne contenait pas d'indol, alors que les cultures mêmes prenaient une coloration rose par addition de nitrite de potassium et d'acide sulfurique.

On ne prêta guère attention à ces faits pourtant intéressants et 5 ans après, Herter et Ten Broeck n'en tinrent aucun compte quand, après avoir examiné seulement deux races, ils publièrent que le *Proteus* cultivé dans une solution de peptone de Witte (1 p. 100) et d'extrait de viande Liebig (0,4 p. 100) produit un peu d'indol et une quantité notable d'acide indolacétique.

Dans un travail paru à peu près à la même époque que celui de Herter, Cantù considère ce microbe comme un producteur d'indol et, bien qu'il en ait étudié plus de 180 échantillons, il ne dit pas en avoir trouvé qui n'ait pas ce caractère.

En 1912, Louis Gauthier (4), se basant sur l'examen de deux

(1) FELTZ, *loc. cit.*

(2) L. GRIMBERT, De l'unification des méthodes de culture en bactériologie. *Archives de Parasitologie*, t. I, n° 2, p. 191, 1898.

(3) STEENSMA, Ueber den Nachweis von Indol ... in Bakterienkulturen. *Centralbl. f. Bakteriologie*, Originale, mai 1906, t. XLI, p. 215.

(4) LOUIS GAUTHIER, Recherches sur l'indol en microbiologie. *Thèse de Pharmacie*, Lyon, 1912.

rares, publia que les cultures de *Proteus* dans une solution de peptone pancréatique contiennent toujours de l'indol au bout de 12 heures.

Enfin, quelques mois plus tard, J. J. van Loghem et J. C. W. van Loghem-Pouw (1), après avoir étudié 30 échantillons, confirmèrent les résultats obtenus par Steensma et crurent bien faire de considérer comme représentants d'une espèce à part, *Bacillus proteus anindologenes*, les *Proteus vulgaris* ne donnant pas d'indol.

En présence d'une telle confusion il m'a semblé utile de déterminer, d'une manière aussi précise que possible, quelle est la valeur réelle de la fonction indologène en tant que caractère spécifique du *Proteus vulgaris*. Pour cela, j'ai fait porter mes recherches sur les 61 *Proteus* dont je disposais.

Avant d'exposer le détail de mes expériences, je crois bon d'insister quelque peu sur les procédés que j'ai employés pour déceler la présence de l'indol dans les cultures microbiennes.

Jusqu'à ces dernières années, pour caractériser cette substance, les bactériologistes utilisaient généralement une réaction basée sur la formation de nitroso-indol. Cette réaction se pratique le plus souvent suivant la technique adoptée par Kitasato (2) lors de ses premières recherches sur les microbes indologènes, c'est-à-dire qu'à 10 cent. cubes d'une culture en bouillon ou en eau peptonée on ajoute 1 cent. cube d'une solution aqueuse de nitrite de sodium ou de potassium à 0,2 p. 1000, puis quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 22° B^e ou d'acide sulfurique à 66° B^e. Une coloration rouge ou rose indique la présence d'indol; la sensibilité de la réaction peut être accrue en rassemblant dans l'alcool amylique le nitroso-indol formé.

Bien que ce procédé de recherche soit encore employé très fréquemment, depuis 1901, on tend de plus en plus à lui substituer la réaction d'Ehrlich au p. diméthylaminobenzaldéhyde

(1) J. J. VAN LOGHEM et J. C. W. VAN LOGHEM-POUW, Beitrag zur Differenzierung der Proteus-Gruppe. *Centralbl. f. Bakteriologie*. Originale, t. LXVI, 24 août 1912.

(2) KITASATO, Die negative Indol-Reaktion der Typhusbazillen im Gegensatz zu anderen ähnlichen Bazillenarten. *Zeitschr. f. Hygiene*, t. VII, 1889, p. 515.

qui est d'une extrême sensibilité (1). Dans les laboratoires de bactériologie on l'effectue généralement en ajoutant à 10 cent. cubes d'une culture, en bouillon ou en eau peptonée, quelques centimètres cubes d'une solution alcoolique de diméthylaminobenzaldéhyde à 2 p. 100, puis avec précaution quelques gouttes d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique concentré. Certains expérimentateurs croient utile d'ajouter un persulfate ou un nitrite alcalin ou de faire la réaction à chaud.

Bien d'autres réactions permettent, comme on le sait, de caractériser l'indol, mais je ne m'en occuperai point ici, car leur emploi est rarement utile dans le cas qui nous occupe. Je préfère m'en tenir aux deux que je viens de citer et montrer combien la valeur des résultats qu'elles fournissent dépend des conditions dans lesquelles elles sont effectuées.

Pendant longtemps on s'est contenté d'ajouter directement aux cultures du nitrite de sodium et de l'acide; puis, pour déceler les très petites quantités d'indol, on eut l'idée de caractériser ce composé non plus dans les cultures mêmes, mais dans leur distillat. Cette manière de faire avait en même temps l'avantage de supprimer une importante cause d'erreur, surtout avec les réactifs modernes; avec elle on évitait de pratiquer la recherche de l'indol en présence de certaines substances qui existent dans les cultures et qui peuvent donner lieu à des colorations gênantes. De nombreux auteurs, et notamment Steensma, montrèrent l'intérêt qu'il y avait de préférer à toute autre technique la distillation des cultures; pourtant celle-ci ne méritait guère, ainsi que nous allons le voir, la confiance qu'ils lui accordaient.

Porcher et Panisset (2) ont établi, en effet, que dans les cultures microbiennes, même d'espèces ne donnant pas d'indol, peuvent se former certaines substances, qui ont comme caractère commun de se décomposer facilement en donnant de

(1) EHRLICH, Ueber die Dimethylaminobenzaldehyd-Reaktion, *Deutsche med. Wochenschrift*, 1901, n° 15.

(2) CH. PORCHER, Des corps indologènes dans l'urine, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 3 mai 1909.

CH. PORCHER et L. PANISSET, Recherche de l'indol dans les bouillons microbiens, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 24 août 1909. Des composés indologènes dans les cultures liquides, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 17 mai 1909.

l'indol; or l'une d'elles, l'acide indolcarbonique, se dissocie même lorsqu'on porte simplement sa solution aqueuse à l'ébullition. La présence de tels composés indologènes rend donc illusoire la précaution que l'on prenait de distiller les cultures et, pour extraire l'indol qui peut se trouver dans celles-ci, il apparaît indispensable d'avoir recours à d'autres procédés qu'à l'entraînement par la vapeur d'eau. Celui qui convient le mieux est certainement l'épuisement des liquides à analyser par l'éther convenablement purifié.

Porcher et Panisset ont donc eu le mérite de révéler une grave cause d'erreur dans l'étude de la fonction indologène des microbes et de rappeler en même temps aux bactériologistes qu'on ne doit jamais caractériser directement un corps dans une culture microbienne. Malheureusement leurs conseils n'ont pas été suivis comme ils le méritaient, à tel point que les résultats obtenus par Steensma, en 1906, sont sûrement plus près de la vérité que ceux publiés dans nombre de travaux récents.

En effet, certains auteurs, ennemis de ce qu'ils appellent dédaigneusement des complications, considèrent comme très suffisant de rechercher l'indol en pratiquant la réaction d'Ehrlich directement dans les cultures. Pas plus qu'ils ne s'inquiètent des recommandations de Porcher et de Gauthier, ils ne tiennent aucun compte des travaux des nombreux chimistes (1) qui ont montré que le diméthylaminobenzaldéhyde donne avec diverses substances, existant normalement dans la plupart des cultures microbiennes et même dans certains milieux stériles, des colorations très difficiles à distinguer de celles que produisent l'indol et le scatol.

Il n'est d'ailleurs pas besoin de connaître les travaux que je viens de signaler, pour se rendre compte des précautions

(1) STEENSMA, Über Farbenreaktionen der Eiweisskörper... mit aromatischen Aldehyden und Nitriten, *Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, t. XLVII, p. 25.

STEENSMA, Die Farbenreaktionen in der Biochemie, *Biochem. Zeitschr.*, t. VIII, p. 203, 1908.

FLEIG, Réactions colorées du tryptophane, de l'indol, du pyrrol, etc... avec les aldéhydes aromatiques, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, juillet 1908.

CL. GAUTIER, Réactions de la phloroglucine et de l'orcéine avec le p. diméthylaminobenzaldéhyde..., *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 23 mai 1908.

RHODE, Die Farbenreaktionen der Eiweisskörper mit p.-dimethylaminobenzaldehyd..., *Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, t. XLIV, 1905, p. 161.

qu'impose l'usage du diméthylaminobenzaldéhyde ; il suffit de se conduire en expérimentateur consciencieux et de ne pas adopter un réactif aussi sensible sans avoir vu ce qu'il donne avec des milieux témoins. Si les auteurs dont je parle plus haut avaient pris ce soin, ils auraient vu que certains milieux usuels et les solutions de certaines peptones, stériles ouensemencés avec des microbes non producteurs d'indol, donnent, lorsqu'on les traite directement avec le réactif d'Ehrlich, des colorations très variées allant du bleu au rouge groseille en passant par toutes les teintes du violet. Je veux croire qu'en présence de constatations de cette sorte, ils n'auraient pas adopté une telle manière de procéder et auraient cherché un moyen d'éviter des causes d'erreur aussi évidentes. Il faut croire toutefois que la nécessité des témoins et des expériences à blanc n'est pas encore admise par tout le monde, car j'ai eu maintes fois l'occasion de voir employer le procédé simpliste dont, après tant d'autres, je viens de montrer les inconvénients (1).

Quoi qu'il en soit, l'exemple est assez curieux des mauvais résultats que peut donner, lorsqu'elle est utilisée sans précaution, une méthode excellente et très sensible. Il est pourtant bien facile ainsi qu'on le verra plus loin, d'appliquer correctement la réaction d'Ehrlich et d'en obtenir des résultats ne prêtant guère à discussion. Bien entendu toutes les réserves que je viens de faire ne s'appliquent qu'aux travaux récents et, pour identifier des microbes appartenant à des espèces décrites depuis longtemps comme producteurs d'indol, il faudra toujours se servir du procédé au nitrite tels que l'utilisaient les anciens auteurs, quitte à compléter ou corriger leurs observations en faisant des témoins et en employant des méthodes plus rigoureuses.

Enfin, étant donné ce que l'on sait sur l'origine de l'indol qui se forme dans certaines cultures microbiennes, on conçoit sans peine que les microbes capables d'attaquer le tryptophane, de

(1) On trouvera dans un travail de H. Seidelin et Fr. Lewis (Some notes on indole-reaction and allied phenomena, *Journal of Hygiene*, décembre 1911, p. 504) un exemple des pertes de temps, des incertitudes et des difficultés d'interprétation auxquelles expose la méconnaissance des faits révélés par Neubauer, Cole, Rhode, Porcher, Steensma et Gauthier.

quelque manière que ce soit, manifesteront beaucoup mieux leur action lorsqu'ils se trouvent directement en présence de cet acide aminé libre et qu'ils n'auront pas à le séparer d'un édifice moléculaire le plus souvent très complexe.

Comme l'on sait que le meilleur procédé de préparation du tryptophane consiste dans la digestion tryptique, aseptique et prolongée, de matières albuminoïdes convenablement choisies, on doit donc, pour préparer les milieux destinés à l'étude de la fonction indologène, donner la préférence aux « peptones pancréatiques », particulièrement à celles de caséine. Toutefois, il vaut encore mieux, comme je vais le montrer, employer des milieux de composition bien définie auxquels on incorpore du tryptophane.

J'ai déjà rapporté sommairement les résultats que j'avais obtenus en examinant 57 races de *Proteus vulgaris* au point de vue de leur fonction indologène (1); je vais maintenant les exposer plus complètement, tels que je les ai confirmés par l'étude de quatre autres échantillons, en précisant autant que possible les conditions dans lesquelles mes recherches ont été réalisées.

J'ai d'abord ensemencé tous mes *Proteus* dans de l'eau peptonée à 20 p. 1.000. Celle-ci était préparée avec une peptone commerciale obtenue par digestion tryptique de la viande et donnant nettement avec l'eau de brome la réaction du tryptophane; comme l'extrait éthéré de cette même peptone donnait une légère coloration rose avec le réactif d'Ehrlich, je prenais la précaution, indiquée par Porcher, de réduire au cinquième de son volume, par une vive ébullition à l'air libre, la solution à 20 p. 1.000. Après avoir rétabli, par addition d'eau distillée, le volume primitif de celle-ci, la neutralisais par la soude; j'avais ainsi une eau peptonée débarrassée des traces d'indol décelables par le diméthylaminobenzaldéhyde. J'ai donc cultivé sur ce milieu les 61 *Proteus* dont je disposais et, après 24 heures de séjour à 37 degrés, j'ai recherché l'indol dans les cultures par le procédé suivant (2):

1° Opérer sur 10 à 15 cent. cubes de culture; prendre la réaction de

(1) ALBERT BERTHELOT, Recherches sur quelques caractères spécifiques du *Proteus vulgaris*. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 15 mars 1913, t. LXXIV, p. 573.

ALBERT BERTHELOT, Recherches sur le *Proteus vulgaris* considéré comme producteur d'indol. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 24 février 1913, t. CLVI, p. 641.

(2) Ce procédé ne diffère de celui de Porcher et Panisset que par l'alcalinisation préalable de la culture, alcalinisation ayant surtout pour but, dans le cas du *Proteus* d'empêcher l'entraînement de l'acide indolacétique par l'éther (Sur la recherche de l'indol dans les milieux liquides des cultures, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1911, t. LXX, p. 369 et 371).

celle-ci au papier de tournesol et, si besoin est, l'additionner de quelques gouttes de lessive de soude pour l'*alcaliniser franchement*.

2° Ajouter à la culture contenue dans un tube à essai son volume d'éther purifié spécialement (1); agiter doucement pendant quelques minutes, puis laisser déposer jusqu'à ce que la couche éthérée soit bien limpide, au moins dans la moitié supérieure de sa hauteur — dans le cas d'une émulsion par trop stable, disloquer celle-ci par addition de quelques gouttes d'alcool.

3° Avec un tube à effilure courte dont on se sert à la manière d'un tâtevin, prélever en s'y reprenant à plusieurs reprises, quelques centimètres cubes de la solution éthérée, en prenant bien garde de n'entraîner aucune gouttelette du milieu de culture (2).

4° Aux 3 ou 4 cent. cubes d'éther ainsi recueillis dans un tube à essai, ajouter le quart de leur volume d'une solution de diméthylaminobenzaldéhyde à 4 p. 100, dans l'alcool à 96 degrés; agiter pour bien mélanger les deux liqueurs.

5° A l'aide d'un tube effilé faire arriver lentement au fond du tube renfermant le mélange solution éthérée + réactif, 2 ou 3 cent. cubes d'acide chlorhydrique. Laisser reposer cinq minutes; examiner alors le tube devant un fond blanc. La présence d'indol dans la culture examinée est caractérisée par l'apparition d'un anneau rouge légèrement violacé dans la zone de contact des deux liqueurs; lorsque la proportion d'indol est assez forte, la coloration s'étend à toute la couche inférieure. Une teinte plus violacée, une tendance vers le bleu s'accusant avec le temps est l'indice de la présence de scatol (3) ou tout au moins d'un mélange de ce corps avec l'indol; bien entendu, dans ce cas, on ne doit pas s'en tenir à cette simple coloration et il faut utiliser des réactions différentielles plus nettes, qui sont fort bien exposées dans la thèse d'Hervieux.

Le procédé que je viens de décrire est moins rationnel que celui de L. Gauthier, mais, ainsi que je l'ai maintes fois vérifié, il fournit des résultats *qualitatifs* tout aussi exacts. Son seul point délicat réside dans la séparation de la solution éthérée, bien que, lorsqu'on opère avec soin, il soit impossible d'entraîner des gouttelettes aqueuses avec l'éther.

Il est d'ailleurs très simple de se mettre à l'abri de toute cause d'erreur de cette sorte en agitant doucement, dans un tube étroit, les quelques centimètres cubes de liqueur éthérée avec leur volume d'eau légèrement alcalinisée par la soude; en laissant reposer pendant quelques instants il est alors facile de puiser avec une pipette effilée une quantité suffisante de solution éthérée totalement exempte d'impuretés, capable de donner une coloration avec le réactif d'Ehrlich. Même en prenant l'excès de précautions que je viens d'indiquer il ne m'a jamais fallu plus de dix minutes pour rechercher l'indol dans une culture.

(1) Sur la nécessité et la technique de cette purification voir la thèse de Louis Gauthier (page 20); pour purifier l'éther je me contente ordinairement de le laver avec le tiers de son volume d'une solution de soude à 5 p. 100, puis, à deux reprises avec de l'eau distillée.

(2) Quand on opère sur un petit volume de culture il est très commode, ainsi que mon regretté collègue M. D. M. Bertrand en a eu l'idée, d'employer une pipette de Wright à tétine de caoutchouc.

(3) Avec le scatol seul la teinte primitivement violette devient complètement bleue en trente minutes.

J'ai donc examiné avec cette méthode les cultures de 24 heures de mes *Proteus*, sur peptone pancréatique de viande, et j'ai constaté que seulement vingt-quatre d'entre elles contenaient de l'indol. En présence de ce résultat j'ai ensemencé les échantillons qui ne donnaient pas d'indol dans plusieurs séries de tubes du même milieu et j'ai analysé les cultures après 2, 4 et 8 jours d'étuve ; cette fois encore je n'ai pu trouver trace d'indol.

Mais dès le deuxième jour, les cultures de sept de ces *Proteus* non producteurs d'indol, ont pris une teinte rose lorsque j'y ai ajouté les proportions habituelles de nitrite de potassium et d'acide chlorhydrique, alors que toutes les autres restaient incolores. Les résultats obtenus par Herter ayant attiré mon attention sur la présence possible d'acide indolacétique, je n'ai pas été, comme Steensma, intrigué par la réaction colorée que me présentaient ces cultures et j'y ai cherché cette substance.

Pour cela j'ai immédiatement ensemencé chacun des *Proteus* non indologènes dans 750 cent. cubes d'eau peptonée et, au bout de 48 heures, sur 50 cent. cubes des diverses cultures, j'ai répété l'essai avec le nitrite. En même temps j'effectuais celle-ci avec de l'eau peptonée additionnée d'une part de traces d'indol, d'autre part de traces d'acide indolacétique. J'ai remarqué immédiatement que les cultures de *Proteus* et l'eau peptonée chargée d'acide indolacétique, prenaient une teinte rosée légèrement violacée, peu accusée, tandis que l'eau peptonée chargée d'indol se colorait nettement en rouge. Dans toutes ces liqueurs j'ai extrait la substance colorante avec le même volume d'alcool amylique. Les différences de coloration se sont encore accusées ; j'ai alors dilué avec de l'alcool amylique les solutions trop foncées, de manière à les amener à peu près à la même intensité colorante et je les ai examinées au spectroscope.

J'ai constaté que les solutions amyliques provenant de cultures de *Proteus* non indologènes et d'eau peptonée chargée d'acide indolacétique donnaient, pour une même épaisseur, un spectre caractérisé par une bande d'absorption dans le vert, bien accusée entre les longueurs d'onde $\lambda = 560$ et $\lambda = 530$, se dégradant vers le jaune jusqu'à $\lambda = 575$ et vers le bleu jusqu'à $\lambda = 515$, tandis que la solution amylique de nitrosoindol absorbait le vert, le bleu, l'indigo et le violet du spectre à partir de la longueur d'onde $\lambda = 565$, l'absorption commençant même au voisinage de $\lambda = 582$.

Par l'examen spectroscopique il semblait donc bien probable que les *Proteus* qui donnaient une réaction colorée avec le nitrite, étaient simplement des producteurs d'acide indolacétique. Je m'en suis assuré de la façon suivante : Les 700 cent. cubes de culture qui me restaient après l'épreuve spectroscopique ont été légèrement acidifiés par l'acide sulfurique et épuisés par l'éther dans une boule à décantation : la liqueur éthérée (500 cent. cubes environ) a été réduite au cinquième par distillation et agitée avec la moitié

de son volume (50 cent. cubes environ) d'eau faiblement alcalinisée par la soude. La liqueur aqueuse décantée, additionnée d'acide chlorhydrique jusqu'à très faible réaction acide, a été maintenue quelques instants à 45 degrés pour chasser l'éther dissous.

De petites portions des liqueurs aqueuses ainsi obtenues pour les 7 *Proteus*, ont alors été examinées en même temps qu'une solution aqueuse d'acide indol-3-acétique à 1 p. 1.000; toutes m'ont donné un résultat positif avec les réactions considérées par Salkowsky et Herter (1) comme caractéristiques :

1° Avec HCl et NO³K production d'une coloration rose passant complètement dans l'alcool amylique et donnant une bande d'absorption dans le vert.

2° Avec HCl et traces de Fe³Cl³ production d'une coloration voisine du rouge cerise.

J'ai alors épuisé par l'éther le reste des solutions légèrement acides, dont j'avais utilisé une très faible partie pour les réactions ci-dessus, et j'ai concentré par distillation les liqueurs étherées résultant de cet épuisement. J'ai versé le résidu de ces distillations dans des petits ballons à fond rond et j'ai chassé le reste d'éther en les maintenant à 60 degrés. A ce moment j'ai placé les ballons sur un bain de sable que j'ai maintenu à 110-115 degrés pour chasser l'eau que l'évaporation avait laissée, puis j'ai élevé la température à 210 degrés, mais en ayant soin de ne chauffer que le fond des ballons, c'est-à-dire la partie sur laquelle existait un léger résidu. Après 10 minutes de chauffage, j'ai laissé refroidir les ballons et j'ai repris par quelques centimètres cubes d'alcool le léger enduit qui se trouvait sur leurs parois; j'ai traité la solution alcoolique ainsi obtenue par le réactif d'Ehrlich et l'acide chlorhydrique. Toutes contenaient du scatol car elles m'ont donné une coloration violacée d'abord peu accentuée, mais qui a foncé rapidement et s'est changée assez vite en une teinte bleue, présentant un spectre d'absorption parfaitement caractéristique. L'existence de ce scatol, qui se forme quand on chauffe à sec vers 200 degrés l'acide indolacétique, était une preuve de la présence de cette substance dans les liqueurs que je venais d'examiner.

J'avais donc établi par trois réactions qu'il s'agissait bien d'acide indol-3-acétique, confirmant en somme les faits observés par Herter et Ten Broeck avec seulement deux races de *Proteus*.

Pour me placer dans de meilleures conditions, j'ai répété l'expérience que je viens de décrire en substituant à la peptone de viande une peptone tryptique de caséine que je devais à l'obligeance de M. P. Macquaire (2); les résultats ont été exactement les mêmes que dans le premier cas : 24 *Proteus*

(1) C. A. HERTER, On indolacetic acid, *Journal of biological Chem.*, t. IV, 1908, p. 254.

(2) En 1911, Porcher et Panisset avaient déjà signalé l'intérêt que présenterait une peptone de cette nature pour l'étude de la fonction indologène des microbes : Les diverses peptones et la formation de l'indol. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXX, p. 464.

producteurs d'indol, 37 *Proteus* non indologènes dont 7 producteurs d'acide indol-acétique.

J'ai alors voulu rechercher si une variation plus importante dans la composition du milieu ne modifierait pas ces résultats. Pour cela j'ai utilisé un mélange de produits abiurétiques obtenus par l'hydrolyse chlorhydrique de la caséine, mais comme l'action des acides ne convient pas à la séparation du tryptophane, j'avais soin d'ajouter à ce mélange, bien décoloré par le noir animal, 1 p. 100 de tryptophane ; avec cet ensemble de constituants de la caséine, je préparais des solutions à 20 p. 1.000 qui constituaient un milieu dans lequel le *Proteus* se développait remarquablement bien. Dans ces conditions les résultats ont été identiques en ce qui concerne la production d'indol, tout au moins qualitativement, mais le nombre des échantillons producteurs d'acide indolacétique est passé de 7 à 19 ; en même temps j'ai noté que, tant pour l'indol que pour l'acide indolacétique, la production de ces substances était beaucoup plus intense qu'en milieu peptoné.

Ces faits m'ont conduit à me servir d'un milieu encore mieux adapté à l'étude de la fonction indologène, plus riche par conséquent en substances mères de l'indol et de l'acide indolacétique, c'est-à-dire en tryptophane. J'ai d'abord utilisé un milieu chimiquement défini dont j'avais déjà indiqué la composition (1) et qui renfermait, avec 1,5 p. 1.000 de tryptophane, divers autres acides aminés et des sels, mais je l'ai abandonné pour l'étude du *Proteus*, car certains de ces éléments indispensables pour nombre de microbes étaient inutiles pour une espèce protéolytique et d'une telle activité biochimique.

(1) ALBERT BERTHELOT, Sur l'emploi de milieux chimiquement définis à base de tryptophane, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 20 avril 1912, t. LXXII, p. 595. A propos des milieux de culture au tryptophane et de l'utilisation de ceux-ci pour l'étude de la fonction indologène des microbes, je tiens à signaler deux mémoires qu'un auteur allemand, Hugo Zipfel, a publiés sur ce sujet en 1912 et 1913 (*Centr. f. Bakt. I Abt.* Originale t. LXIV, juin 1912, p. 65 et t. LXVII, janvier 1913, p. 497). Ces deux mémoires ne comportent pas moins de 31 pages de texte, l'auteur y énumère un nombre considérable de travaux sur les bactéries productrices d'indol ; il y indique même le procédé de préparation du tryptophane, et y donne plus de 150 indications bibliographiques ; mais, par une singulière coïncidence, il se trouve que, parmi les nombreux noms d'auteurs qu'il cite, ne figurent pas celui de Seidelin et le mien. L'un et l'autre nous avons pourtant employé bien avant lui le tryptophane dans les milieux et nous l'avons appliqué à l'étude de la fonction

Pour les expériences qui vont suivre il m'a donc paru plus simple d'imiter Hopkins et Cole et d'ajouter de la gélatine à une solution nutritive analogue à celle que j'ai préconisée lors de mes premières recherches sur les microbes acidaminolytiques de la flore intestinale. La gélatine ne renfermant pas de tryptophane, le *Proteus* n'avait donc à sa disposition que celui existant à l'état libre dans le milieu, qui présentait la composition suivante :

Eau.	1.000,00
Phosphate dipotassique.	1,50
Sulfate de magnésium.	0,50
Tryptophane.	1,50
Chlorure de calcium.	0,02
Gélatine.	25,00

Grâce à l'amabilité de M. F. Hoffmann-La Roche qui avait mis à ma disposition une quantité assez importante de tryptophane parfaitement pur, j'ai pu étudier l'action de toutes mes races de *Proteus* sur cet acide aminé.

J'ai examiné une première série de cultures après 48 heures de séjour à 37 degrés et j'ai constaté que le nombre des échantillons producteurs d'indol était le même que dans les essais précédents; par contre il y avait 31 *Proteus* producteurs d'acide indolacétique. D'autres cultures examinées après quatre jours d'étuve m'ont donné les mêmes résultats pour l'indol, mais cette fois tous les *Proteus* non indologènes avaient produit de l'acide indolacétique. Je ne m'en suis pas tenu là et j'ai recherché si les échantillons qui avaient donné de l'indol n'avaient pas produit en même temps de l'acide indolacétique. Pour cela, après avoir alcalinisé par la soude les cultures sur milieu au tryptophane chargées d'indol, je les ai épuisées par l'éther jusqu'à ce que ce dissolvant ne m'ait plus donné de coloration avec le réactif d'Ehrlich; après cette opération, je pus déjà observer, sur une petite portion de ces cultures complètement débarrassées d'indol, qu'elles

indologène des microbes (A. Berthelot, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 24 juillet 1911, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, avril 1912, *loc. cit.*). Zipfel n'a pas davantage tenu compte de l'excellent travail de Louis Gauthier (mars 1912 *loc. cit.*) qui a réalisé avec des méthodes analytiques précises les recherches que l'auteur allemand a exécutées avec des procédés incorrects en dépit de leur apparente exactitude. M. Zipfel oublie par trop facilement que les principes fondamentaux de l'analyse chimique ne varient pas avec l'objet auquel on les applique et que, pour caractériser un corps dans une culture microbienne, l'on doit toujours s'efforcer de l'extraire et de le purifier. En utilisant les milieux au tryptophane pour étudier systématiquement les bactéries productrices d'indol, H. Zipfel n'a fait qu'imiter certains auteurs qu'il ne daigne pas citer; il est regrettable pour lui qu'il ne se soit pas en même temps inspiré de L. Gauthier et qu'il n'ait pas accordé un peu plus d'attention aux conseils donnés par Porcher et Panisset, car la valeur scientifique de son travail y aurait certainement beaucoup gagné.

prenaient une coloration rose par addition de nitrite et d'acide chlorhydrique, alors qu'un tube témoin du milieu stérile n'accusait qu'une légère teinte jaune. Je soumis alors ces mêmes cultures à un nouvel épuisement par l'éther après les avoir acidifiées et, après concentration de ce solvant, il me fut facile de constater la présence d'acide indolacétique.

En résumé, mes 61 *Proteus* cultivés sur tryptophane se montraient tous producteurs d'acide indolacétique au bout de quatre jours, tandis que seulement 24 d'entre eux étaient capables de former de l'indol. Ces résultats auraient pu me faire croire à l'existence de deux variétés de *Proteus* ; mais, en présence des variations de ce microbe sous l'influence du milieu, j'ai pensé qu'il devait plutôt s'agir de races différant simplement par une intensité plus ou moins grande de leur action sur le tryptophane ou les substances qui en renferment, action beaucoup trop variable pour que ses divers degrés puissent être utilisés comme caractères différentiels. Je n'ai pas tardé à m'apercevoir combien cette hypothèse était exacte.

En effet, au mois d'octobre 1912, j'ai examiné à nouveau 24 *Proteus* de diarrhées infantiles que j'avais étudiés au mois de février de la même année et qui avaient subi de nombreux passages en gélatine préparée avec du bouillon Martin ; bien que je me sois placé dans les mêmes conditions et que j'aie utilisé le même milieu (solution de peptone pancréatique de viande à 20 p. 1.000), j'ai constaté que 6 *Proteus*, qui, primitivement produisaient de l'indol et de l'acide indolacétique, ne donnaient plus que de ce dernier corps, tandis que 11 autres, qui ne formaient que de l'acide indolacétique, étaient devenus également producteurs d'indol. Le *Proteus vulgaris* présentait donc bien la grande variabilité d'action que je lui attribuais *a priori* et qui me faisait paraître peu probable l'existence de races bien fixées au point de vue du pouvoir indologène.

Ayant ainsi observé une variation spontanée de ce caractère du *Proteus*, j'ai essayé d'obtenir plus rapidement une modification analogue. Dans ce but, j'ai pris au hasard, parmi les échantillons dont l'expérience précédente m'avait montré la fixité d'action, 3 *Proteus* qui m'avaient toujours donné de l'indol, en solution de peptone pancréatique de viande, et 3 autres qui, au contraire, n'avaient jamais produit que de l'acide indolacétique. Je les ai ensemencés en même temps dans une solution de peptone pancréatique de caséine à 3 p. 100, dans une solution renfermant, avec les sels habituels, 2 p. 1.000 de tryptophane avec seulement 5 p. 1000 de gélatine et enfin dans une solution à 20 p. 1000 de l'ensemble des acides aminés qui entrent dans la constitution de la molécule de caséine.

J'ai examiné les cultures au bout de 72 heures de séjour à 37 degrés et j'ai constaté que sur peptone de caséine les 6 échantillons donnaient de l'acide indolacétique et qu'un seul des 3 indologènes donnaient de l'indol. Au contraire, sur les deux autres milieux, tous les échantillons donnaient à la fois de l'indol et de l'acide indolacétique. Enfin, j'ai analysé de nouveau, après quinze jours d'étuve, les cultures sur peptone de caséine, mais j'ai obtenu les mêmes résultats, c'est-à-dire qu'une seule renfermait de l'indol. Pendant un mois, j'ai continué à cultiver ces 6 *Proteus* sur les trois milieux, et, après leur avoir ainsi fait subir six passages, j'ai constaté que leur action respective sur le tryptophane ne s'était pas modifiée. Par conséquent, sur six échantillons, un seul avait gardé ses propriétés primitives, trois autres semblaient avoir acquis, dans les milieux contenant du tryptophane libre, la faculté de produire de l'indol, tandis que les deux derniers, en passant par la solution de peptone de caséine, avaient perdu leur pouvoir indologène.

En présence de ces faits il était intéressant de rechercher si les propriétés des *Proteus* ainsi cultivés en milieux spéciaux étaient modifiées définitivement ou s'il s'agissait simplement de variations apparentes essentiellement dépendantes de la composition du milieu. C'est ce que j'ai fait en ensemençant à nouveau dans une solution à 20 p. 1.000 de peptone de viande les 5 échantillons dont les caractères semblaient avoir varié; j'ai alors constaté que les deux races qui avaient perdu leur pouvoir indologène ne le recouvraient pas dans le milieu primitif et que les trois autres, devenues capables de produire de l'indol, ne donnaient plus dans ce milieu que de l'acide indolacétique, ainsi qu'elles le faisaient antérieurement.

Si j'avais borné là mes recherches j'aurais pu tout au moins conclure à la possibilité de variations régressives stables; mais, connaissant l'extrême variabilité du *Proteus*, j'ai continué à étudier les races que j'avais utilisées pour mes dernières expériences. J'ai repiqué ces 6 *Proteus* sur gélatine au bouillon Martin et, après 8 passages effectués en deux mois, j'ai examiné de nouveau leurs cultures en solution de peptone de viande (72 heures à 37 degrés). Dans ces conditions, j'ai observé que les 6 échantillons avaient repris leurs propriétés primitives, c'est-à-dire que tous donnaient de l'acide indolacétique et que les trois anciens producteurs d'indol en formaient comme par le passé. Les variations apparentes du pouvoir indologène que j'avais déterminées brusquement n'étaient donc bien que des modifications essentiellement transitoires.

Enfin, j'ai étudié plus complètement l'action de ces 6 *Proteus* sur le tryptophane, à l'aide des cultures obtenues en présence de 2 p. 1.000 de cet aminoïque et de 5 p. 1.000 de gélatine. Ainsi que je l'ai déjà dit, dans ce milieu, après 72 heures à 37 degrés, les 6 échantillons ont produit de l'indol et de l'acide indolacétique. J'ai laissé séjourner des cultures à l'étuve pendant encore 15 jours et, au bout de ce temps, j'y ai trouvé beaucoup plus d'indol; par contre, c'est à peine si j'ai pu y caractériser l'acide indolacétique, alors que cette substance existait en forte proportion dans les jeunes cultures.

Toutefois, si l'acide indolacétique avait presque complètement disparu, peut-être l'indol était-il accompagné d'un autre dérivé plus simple du tryptophane? Par la recherche même de l'indol j'avais la preuve que mes cultures ne renfermaient pas de scatol, mais peut-être contenaient-elles de l'acide indol-carbonique, cette substance indologène dont Porcher a montré la présence dans les cultures de certains microbes?

Pour m'en rendre compte, j'ai employé ce qui me restait de mes six cultures de 15 jours sur tryptophane; à ce moment elles étaient déjà complètement débarrassées de leur indol par des lavages à l'éther, en présence d'un léger excès de soude. Je les ai *exactement neutralisées* avec HCl et je les ai distillées: les 6 distillats contenaient de l'indol que j'ai caractérisé par le diméthylaminobenzaldéhyde et la formation du dérivé nitrosé; le liquide distillé renfermait donc de l'acide indol-carbonique. Dans le résidu de ces distillations j'ai retrouvé les traces d'acide indolacétique dont j'avais antérieurement constaté la présence. J'ai extrait cette substance en épuisant par l'éther la liqueur légèrement acidifiée; j'ai débarrassé celle-ci de l'excès d'éther en la chauffant quelques instants au bain-marie, puis, après l'avoir étendue d'eau, je l'ai filtrée sur bougie. Dans le filtrat ainsi obtenu, avec l'eau de brome et le réactif glyoxylique, j'ai obtenu pour les six cultures les réactions caractéristiques du tryptophane; tout cet acide aminé n'avait donc pas été détruit en 15 jours par le *Proteus*.

Quant à l'acide indolcarbonique, sa présence, à côté de l'indol et de traces

d'acide indolacétique, est incontestable, car j'ai vérifié que la distillation de 200 cent. cubes de milieu au tryptophane additionné de 5 centigrammes d'acide indolacétique et exactement neutralisé donnait un distillat ne réagissant en aucune façon avec le diméthylaminobenzaldéhyde, tandis que dans les mêmes conditions 5 centigrammes d'acide indol-carbonique produisaient une quantité notable d'indol.

Ayant constaté que le *Proteus* peut donner de l'acide indol-carbonique, j'ai recherché cette substance dans des cultures de tout âge en eau peptonée ou en milieu aux acides aminés de la caséine, ainsi que dans des cultures jeunes sur tryptophane; bien que mes essais aient porté sur les six races de mes dernières expériences, je n'en ai pas trouvé par le procédé que je viens d'indiquer. Ce corps me semble exister surtout dans les vieilles cultures en milieu particulièrement favorable; en pratique, au point de vue du simple diagnostic bactériologique, il n'y a donc guère lieu de s'en inquiéter.

On a pu remarquer que, dans mes recherches, j'ai négligé l'acide indol-propionique; je tiens à faire observer que j'avais des raisons d'agir ainsi. En effet, toutes mes cultures ont été effectuées au large contact de l'air; par conséquent, en admettant que le *Proteus* ait pu produire ce corps aux dépens du tryptophane, jamais il n'aurait trouvé dans mes expériences les conditions d'anaérobiose nécessaires. D'ailleurs, aucune de mes cultures, ainsi que je l'ai établi en recherchant l'indol, ne renfermait de scatol, composé qui accompagne ordinairement l'acide indol-propionique dans la destruction anaérobie du tryptophane par certains microbes.

J'aurais dû, pour être complet, rechercher également s'il y avait formation d'indoléthylamine; si je ne l'ai point fait, c'est que la recherche de cette substance ne peut s'effectuer par des méthodes aussi simples que la caractérisation de l'indol, du scatol et des acides à noyau indolique. L'examen de ce point de la biochimie du *Proteus* m'aurait du reste trop écarté de l'étude critique du pouvoir indologène et j'ai préféré le réserver pour des recherches ultérieures.

Enfin, je tiens à insister sur ce fait, que toutes les cultures dont je me suis servi au cours de cette étude ont toujours été obtenues avec des milieux donnant, par le brome, la réaction du tryptophane libre. J'ai laissé systématiquement de côté l'étude des cultures dans lesquelles le *Proteus* aurait dû effectuer une dislocation préalable d'une molécule albuminoïde quelconque pour en libérer le tryptophane, car il m'aurait fallu tenir compte non seulement des variations de l'activité d'attaque de cet amino-acide, mais encore de la variabilité des pouvoirs protéolytique, peptolytique ou peptidolytique.

Je n'ai donc pas examiné sous toutes ses faces la question de la production d'indol par le *Proteus vulgaris*, mais comme je m'étais placé uniquement au point de vue de la diagnose précise de cette espèce, je crois avoir fait œuvre plus utile en examinant un grand nombre de races dans des conditions assez limitées, mais bien définies.

Quoi qu'il en soit, de l'ensemble de mes recherches il résulte que le *Proteus vulgaris* est un microbe qui attaque le tryptophane en donnant, par le même mécanisme que les autres aérobies étudiés par Hopkins et Cole, une série de produits dont la dégradation plus ou moins avancée marque l'intensité de son action sur la molécule aminoïque. Dans certaines cultures très âgées, en milieu contenant beaucoup de tryptophane, on peut ne trouver pratiquement que de l'indol; dans d'autres, en général assez jeunes et sur milieu pauvre en tryptophane libre, il n'y a que de l'acide indolacétique, mais ce que l'on rencontre le plus souvent c'est à la fois de l'indol et de l'acide indolacétique en proportions variables.

L'action du *Proteus* variant non seulement avec les divers échantillons, mais même pour une race donnée, il est impossible de se baser sur l'absence d'indol dans les cultures de ce microbe pour le différencier des autres espèces. Par contre, et autant que l'on puisse conclure de l'examen de 61 races, on peut dire que tous les *Proteus vulgaris* Hauser sont capables d'attaquer le tryptophane libre et de produire, aux dépens de cet acide aminé, au moins de l'acide indol-3-acétique.

L'espèce *Bacillus proteus anindologenes* Van Loghem n'a aucune raison d'être et l'on doit considérer comme *Proteus vulgaris* Hauser tout microbe possédant, avec les autres caractères de cette espèce, la propriété de donner, à 37 degrés, dans un des milieux que je viens d'indiquer, soit de l'indol ou de l'acide indolacétique, soit un mélange de ces deux corps (1).

(1) Pour la recherche du pouvoir indologène des microbes je ne saurais trop recommander les milieux à base de tryptophane; leur préparation ne présente plus de difficulté maintenant que cet acide aminé se trouve dans le commerce à un prix abordable (5 francs le gramme environ). Il y a cependant une précaution à prendre : exiger des fabricants un produit dont l'extract éthéré ne réagisse en aucune façon avec le réactif d'Ehrlich et dont la solution aqueuse presque incolore ne donne aucune coloration rose ou rouge avec les nitrites et l'acide chlorhydrique dans les conditions habituelles.

NOTA. — Depuis que mon mémoire a été rédigé, M. E.-A.-R.-F. Baudet a publié un travail dans lequel il étudie, au point de vue de la production d'indol, quelques *Proteus* d'origines variées (Indol-reaktionen bei Proteusbacillen, *Folia Microbiologica*, t. II, 3^e fascicule, 7 mars 1914).

Cet auteur emploie le diméthylaminobenzaldéhyde avec le persulfate de potassium et, comme il se sert de milieux au tryptophane, il prétend que l'on peut très bien effectuer la réaction sur la culture même; de plus, il estime que la recherche de l'indol par distillation des cultures est un

procédé parfaitement correct. M. Baudet n'est sans doute pas chimiste, car il considère comme inexistants — bien qu'il les fasse figurer dans sa bibliographie — les travaux de L. Gauthier, Porcher et des nombreux auteurs qui ont montré les inconvénients de la réaction d'Ehrlich mal appliquée et ceux de la distillation des cultures. Il prétend même découvrir les causes d'erreur que peuvent apporter les dissolvants tels que la benzine et l'alcool amylique, comme si les chimistes qu'il critique ne les avaient pas indiquées depuis longtemps et n'avaient point préconisé l'emploi de l'éther convenablement purifié.

Au point de vue des milieux au tryptophane il m'attribue *un* milieu de culture — il en donne même une formule qui comporte 50 *grammes* de SO_4Mg par litre (!) — et le trouve inférieur au milieu de Zipfel; il accorde également une grande importance au fait qu'il n'a pu réussir à faire produire de l'indol à une race indologène comme si la variation d'une propriété biochimique devait obligatoirement se produire dans les mêmes conditions pour des *Proteus* d'origines différentes. Il ne paraît, d'ailleurs, pas connaître les divers termes possibles de la dégradation bactérienne du tryptophane.

Bien qu'il cite une de mes Notes, M. Baudet n'a pas remarqué que j'ai indiqué plusieurs milieux au tryptophane et que je n'ai préconisé spécialement aucun d'eux, mais que j'ai été simplement le premier à recommander et à employer systématiquement les milieux à base de tryptophane pour l'étude de la fonction indologène des microbes. Comme il ignore certainement les travaux d'Herter et qu'il ne paraît pas connaître ceux que j'ai publiés depuis 1912 sur les milieux au tryptophane et sur les caractères du *Proteus*, je ne discuterai pas davantage ses recherches; je me contente de faire remarquer qu'elles justifient une fois de plus les critiques que je me permets dans ce présent travail.

(A suivre.)

L'INDÉPENDANCE DE LA TEMPÉRATURE OPTIMALE D'UNE DIASTASE

A L'ÉGARD DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT ET EN DIASTASE

par ARTHUR COMPTON

(Imperial Cancer Research Fund, Londres.)

On connaît aujourd'hui plusieurs causes modificatrices de l'influence exercée par la chaleur sur l'activité d'une diastase. Parmi les mieux connues, citons d'abord l'origine de la diastase (1), sur laquelle je ferai plus loin une observation de quelque intérêt, ensuite le temps pendant lequel la diastase et son substrat (ou matière organique décomposée) se trouvent en contact (2). Il est important de bien connaître ces causes quand il s'agit de caractériser un ferment par sa température optimale, c'est-à-dire par la température à laquelle son activité est la plus grande. Ces considérations et l'intérêt qu'il y a de préciser la valeur pratique de la température optimale m'ont paru rendre nécessaire de rechercher si la concentration en substrat et la concentration en diastase modifient ou non la température optimale. En outre, des considérations d'ordre théorique m'ont amené à croire que la température optimale d'un ferment est indépendante de la concentration en substrat.

Voici ces considérations :

D'après la théorie de M. Gabriel Bertrand (3) sur la constitution des diastases, tout système diastasique comporte deux substances dont les actions se complètent : la complémentaire

(1) C. J. LINTNER et F. ECKHARDT, *Journ. f. pr. Chem.* (2), t. XLI, 1890, p. 91. — GABRIEL BERTRAND, *Bull. Soc. chim* (3), 1896, t. XV, p. 1218. — GABRIEL BERTRAND et W. MUTERMILCH, *Idem.* (4), t. I, 1907, p. 837. — GABRIEL BERTRAND et M. ROSENBLATT, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIV, 1910, p. 653.‡

(2) GABRIEL BERTRAND et A. COMPTON, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLII, 1911, p. 1518. — M. JAVILLIER et H. TCHERNOROUTZKY, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVII, 1913, p. 440.

(3) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXXIV, 1897, p. 1032 et p. 1385. *Revue générale des Sciences*, t. XVI, 1905, p. 459, etc.

active, et la complémentaire *activante*. La première, généralement de nature minérale, est, comme son nom l'indique, l'agent actif dans la réaction chimique qui caractérise le ferment. La seconde, de nature organique, facilement altérée par la chaleur et d'autres conditions physiques, sert, par une sorte d'effet de concentration, à rapprocher la complémentaire active et le substrat, et à produire des conditions favorables à la vitesse de leur réaction chimique.

Donc, en partant de cette théorie, on peut concevoir que, dans tout système diastasique, il existe deux concentrations du substrat : l'une *locale*, aux environs de la molécule de diastase ; elle est due à l'attraction qu'exerce la complémentaire activante sur les molécules de substrat qui se trouvent dans sa sphère d'action. L'autre, *périphérique* ou *générale*, est située en dehors de la sphère d'attraction de la complémentaire activante. La concentration locale, qui dépend de l'énergie d'attraction de la complémentaire activante, sera plus ou moins constante à une température donnée, tandis que la concentration périphérique variera continuellement. On peut aisément concevoir qu'il existe, entre les deux zones de concentration, à mesure que l'action diastasique se poursuit, un échange continu de molécules de substrat pour des molécules de produits de réaction. Or la température optimale d'une diastase n'est que la température à laquelle s'équilibrent les effets accélérants et destructifs de la chaleur sur l'action qu'exerce la diastase sur le substrat environnant. Pourvu donc qu'il y ait toujours excès de substrat, ces deux effets n'affecteront évidemment que la concentration locale. Par conséquent, on a le droit de s'attendre à ce que la température optimale d'une diastase soit indépendante des variations de la concentration générale.

Cette conception m'a conduit à rechercher sa vérification expérimentale, et à étudier en même temps l'influence de la concentration en diastase sur le phénomène. Je puis donner aujourd'hui les résultats confirmatifs que j'ai obtenus avec la *salicinase*, nouvelle diastase dédoublant la salicine en glucose et saligénine, dont nous avons, M. Gabriel Bertrand et moi (1), tout récemment établi l'individualité.

(1) GABRIEL BERTRAND et A. COMPTON, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLVII, 1913, p. 797.

La préparation diastasique que j'ai employée provient d'un extrait d'amandes douces, et je me suis assuré de la pureté de la salicine par son point de fusion $+200^{\circ}5$ et son pouvoir rotatoire.

$$[\alpha]_{D_{21}} = -62^{\circ}7.$$

Les étapes successives du travail peuvent se résumer ainsi : 1° une détermination préliminaire de l'activité de la préparation diastasique en tenant compte de certaines conditions, telles que concentration du substrat, température et durée de l'expérience; 2° une détermination préliminaire de la température optimale, en employant la quantité de diastase capable d'hydrolyser 50 p. 100 de substrat dans les mêmes conditions de durée et de concentration en substrat; 3° une détermination des courbes d'activité de la diastase à la température ainsi établie, pour cinq concentrations de substrat, M/5, M/10, M/15, M/30, et M/50, l'action ayant la même durée; 4° une détermination de la température optimale de la diastase pour chacune des cinq concentrations du substrat, en présence d'une concentration constante de diastase; 5° une détermination de la température optimale de la diastase, pour chacune des cinq concentrations de substrat, avec les quantités de diastase — indiquées par les courbes d'activité ci-dessus — capables de produire 70 p. 100 d'hydrolyse de substrat en 15 heures; 6° une détermination de la température optimale de la diastase pour une concentration constante de substrat en présence de concentrations différentes de diastase.

La détermination préliminaire de l'activité de la diastase est faite en présence d'une solution M/5 de substrat pendant 15 heures à 40 degrés. Sept tubes à essai soigneusement nettoyés reçoivent, chacun, 286 milligrammes de salicine et une quantité différente de diastase dissoute dans 5 cent. cubes d'eau spécialement purifiée par redistillation dans le vide. Les tubes sont placés dans le bain-marie à 40 degrés pendant 15 heures. On arrête alors l'action diastasique en refroidissant les tubes dans un courant d'eau et en les additionnant d'une goutte d'ammoniaque. Ensuite, d'après la méthode de Gabriel Bertrand (1),

(1) *Bull. Soc. chim.* (3), t. XXXV, 1906, p. 1285.

on dose la quantité de glucoside dédoublée dans chaque tube. Les chiffres obtenus sont indiqués dans le tableau I.

TABLEAU I.

QUANTITÉ DE DIASTASE en milligr.	SALICINE HYDROLYSÉE p. 100.
0,6	34,8
1,5	67,2
3,0	86,8
4,5	91,2
6,0	94,7
7,0	96,4
9,0	97,0

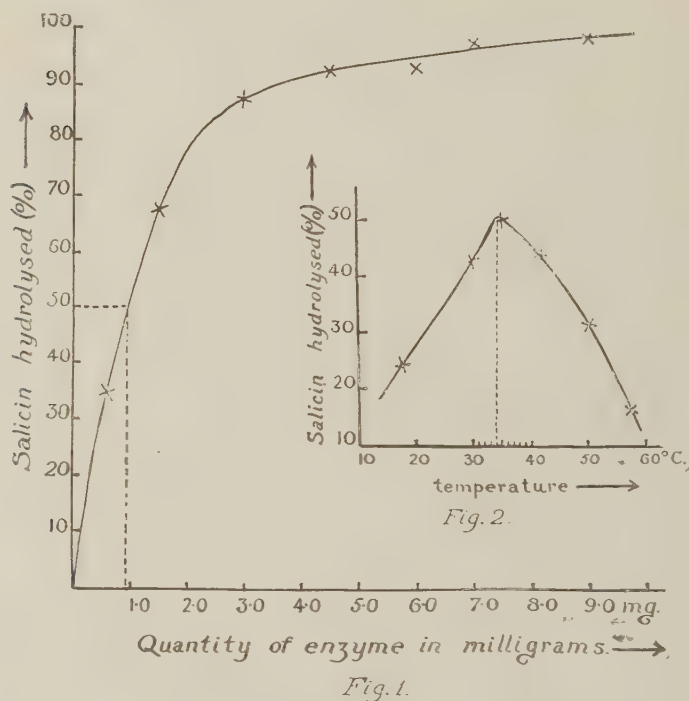
Si l'on porte en abscisses les quantités de diastase et, en ordonnées, les pourcentages de salicine hydrolysée, ces chiffres donnent la courbe d'activité représentée par la figure 1.

La détermination préliminaire de la température optimale de la diastase se fait de la façon suivante. On dissout dans 10 cent. cubes d'eau pure, 10 fois la quantité de diastase nécessaire, indiquée par la figure 1, pour produire le pourcentage voulu d'hydrolyse du substrat, — c'est-à-dire, 0,9 milligramme de diastase, produisant une hydrolyse de 50 p. 100 du substrat en 15 heures. — Après un contact d'une 1/2 heure à 1 heure, à la température ordinaire, on distribue cette solution à raison de 1 cent. cube par tube, dans une série de 8 à 9 tubes à essai contenant chacun 286 milligrammes de salicine et 4 cent. cubes d'eau. Les tubes sont plongés ensuite dans des bains-marie réglés à des températures constantes; au bout de 15 heures on arrête l'action diastasique et on dose la proportion de glucoside hydrolysé. Le tableau II contient les chiffres obtenus.

TABLEAU II.

TEMPÉRATURES EXTRÊMES de chaque expérience.	SALICINE HYDROLYSÉE p. 100.
17°8 à 17°6	24,2
29°3 à 29°5	42,8
34°7	50,0
41°8 à 41°7	43,0
50°2 à 50°3	31,4
57°5 à 57°6	16,4

En portant en ordonnées le pourcentage de salicine hydrolysée et en abscisses la température de l'expérience, ces chiffres donnent la courbe de la figure 2. Dans ces conditions,



Abcisses des figures 1 et 3 : Quantité d'enzyme en milligrammes.
Ordonnées de toutes les figures : Salicine hydrolysée p. 100.

la température optimale se trouve ainsi aux environs de $+34$ degrés.

On détermine ensuite l'activité de la diastase aux environs de $+34$ degrés (exactement $33^{\circ}6-33^{\circ}8$), dans une action de 15 heures de durée, avec les concentrations suivantes de substrat : M/5, M/10, M/15, M/30 et M/50, dont on veut ultérieurement étudier l'effet sur la température optimale de la diastase.

Les autres détails techniques sont les mêmes qu'auparavant. Les chiffres obtenus sont donnés dans le tableau III.

TABLEAU III.

QUANTITÉ DE DIASTASE EN MILLIGR.	SALICINE HYDROLYSÉE P. 100 AVEC CONCENTRATION DE SUBSTRAT				
	M/5	M/10	M/15	M/30	M/50
0,5	»	31,4	35,8	28,2	»
1,0	55,1	57,5	58,5	49,5	36,9
2,0	79,4	84,7	88,7	77,0	»
3,0	88,3	93,9	97,5	90,0	77,2
5,0	94,2	97,5	99,6	99,0	93,9
7,0	94,9	96,7	99,2	100,6	100,0
10,0	95,7	100,2	99,6	»	100,5
12,5	95,7	»	100,6	100,6	100,0

En portant en ordonnées le pourcentage de salicine hydrolysée, en abscisses la quantité de diastase en action, on a les courbes d'activité de la figure 3.

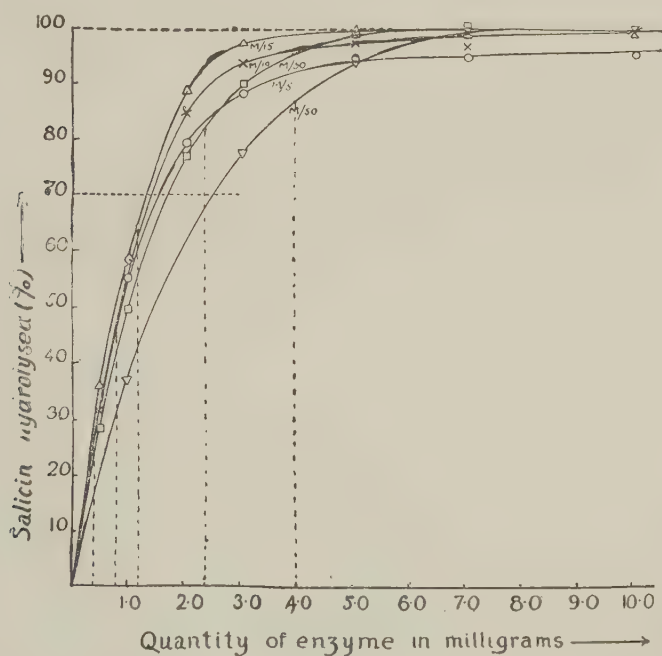


Fig. 3.

On peut maintenant envisager l'influence de la concentration en substrat sur la température optimale du ferment. Il s'agit

d'étudier la température optimale dans une série d'expériences où la concentration en diastase reste constante, tandis que la concentration en substrat varie. On a choisi, d'après la figure 3, comme concentration en diastase, 8×10^{-5} grammes par centimètre cube. On laisse reposer, 1/2 heure à 1 heure, à la température ordinaire, cinq solutions différentes contenant 4, 8, 12, 24 et 40 milligrammes de diastase, dissous dans 10 cent. cubes d'eau. Ces solutions sont réparties à raison de 1 cent. cube par tube dans cinq séries de tubes à essai, contenant 286 milligrammes de salicine et 4, 9, 14, 29 et 49 cent. cubes d'eau. Après 15 heures d'incubation dans des bains-marie réglés à des températures connues, on arrête l'action diastasique et on dose la quantité de salicine hydrolysée dans chaque tube, comme auparavant. Les chiffres obtenus sont ceux du tableau IV.

TABLEAU IV.

TEMPÉRATURES EXTRÊMES de chaque expérience	SALICINE HYDROLYSÉE P. 100 avec concentration en substrat				
	M/5	M/10	M/15	M/30	M/50
7°3 à 7°7		10,8			
8°3 à 9°0	6,6				
9°6 à 8°5			18,3		
9°4 à 10°8				26,0	
12°0 à 10°9					35,5
17°2 à 17°3		23,0			
17°4 à 17°1	10,8				
17°5 à 17°6			32,5		
18°6 à 18°5					57,5
18°9				47,0	
25°2 à 25°0				63,7	
26°4 à 25°7					75,0
26°5	19,2	38,6	50,8		
30°0	22,3	41,9	58,5	75,3	
30°5					75,8
33°5	23,6	44,6	62,9	80,7	88,3
40°5				68,3	76,7
40°7 à 40°6		39,4			
40°8 à 40°7	22,4		55,2		
45°0 à 45°2					56,9
45°5 à 45°3	19,7	35,0	43,7		
45°5				54,7	
50°3 à 50°5	15,1		31,9		
50°6 à 50°5		25,8			
51°1 à 50°8				34,3	
51°5 à 51°2					38,3
51°3 à 51°0	11,2				
51°2 à 51°3		18,4	21,4	24,3	
54°6 à 55°0					25,8

Ces chiffres donnent les courbes de la figure 4.

Ces courbes montrent, quoique avec des degrés de précision bien différents, des maxima dans la même région de température. Elles produisent l'impression générale que la température optimale de la diastase est constante et, par conséquent, indépendante de la concentration en substrat. Pour faire ressortir cette indépendance de façon plus précise, il faut des courbes

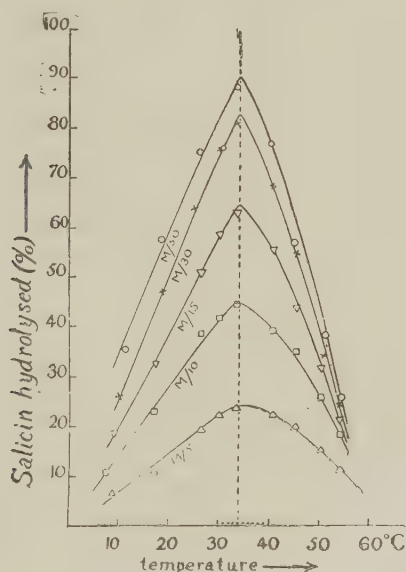


Fig. 4-10. — Substrate concⁿ M/5 to M/50
Enzyme concⁿ 8×10^{-3} gr. per cm³

FIG. 4-10 : Substrate concⁿ = concentration du substrat.

— Enzyme concⁿ gr. par cm³ = concentration de l'enzyme gr. par cm³.

de type uniforme, facilement comparables entre elles. On n'atteint ce but qu'en faisant varier la concentration de la diastase en même temps que celle du substrat, car, *cæteris paribus*, ce qui détermine l'étendue de l'action diastasique, c'est, comme le démontrent les courbes d'activité 1 et 3, le rapport du nombre de molécules de diastase au nombre donné de molécules de substrat, présentes dans le milieu de réaction.

TABLEAU V.

TEMPÉRATURES EXTRÊMES de chaque expérience	SALICINE HYDROLYSÉE P. 100 EN 15 HEURES avec concentration moléculaire de substrat et concentration diastasique en grammes par cent. cube				
	M/5 31×10^{-5}	M/10 $13,5 \times 10^{-5}$	M/15 $8,7 \times 10^{-5}$	M/30 $5,7 \times 10^{-5}$	M/50 5×10^{-5}
8°0			17,2		
9°0 à 8°3		17,3			
9°5 à 9°0				18,8	
17°8 à 17°5	35,0				
18°1 à 18°2		34,2			
18°2 à 18°4					39,7
18°4					41,9
18°7 à 18°5				40,3	
18°8 à 18°7			36,3		
23°1 à 22°5	46,1				
24°9 à 25°1					50,5
26°1 à 26°2			53,3		
26°2 à 26°4				50,3	61,1
27°0		56,9			
29°7	62,2				
30°0 à 30°5				65,7	
30°5					68,6
31°8 à 31°6			63,7		
33°5 à 33°8		69,4	65,8		
33°8				70,0	70,0
34°7 à 34°8					71,7
35°6 à 35°7			65,8		
36°0		69,4			
36°5				66,3	
39°4 à 39°9					59,7
41°8 à 42°0	60,5	58,3			
42°5 à 43°0				56,3	
43°0					53,0
43°6 à 43°5			51,2		
44°0 à 44°4					47,0
47°8 à 48°0		43,3			
48°0 à 48°5				37,7	
48°5			37,7		36,4
49°0 à 49°5					34,1
50°2	44,6				
51°0		35,6			
51°7 à 51°5			30,7		
53°5				22,7	
53°5 à 53°8					22,5
54°6	33,6				22,4
57°5 à 57°4	23,7				

En vue d'avoir des courbes assez prononcées pour que les points maxima soient nettement définis, j'ai voulu obtenir une hydrolyse de 70 p. 100 de substrat à la température optimale pour chaque dilution de substrat étudiée. Un examen rapide de la figure 3, dont les courbes ont été construites à la température d'environ $+34$ degrés, montre que pour obtenir

ces courbes de température optimale — en admettant pour l'instant ce dont la figure 4 indique déjà la probabilité, à savoir, que la température optimale est indépendante de la concentration en substrat et est située approximativement vers $+34$ degrés — les quantités de diastase qu'il faut employer sont 1,55; 1,35; 1,30; 1,70 et 2,50 milligrammes respectivement pour des con-

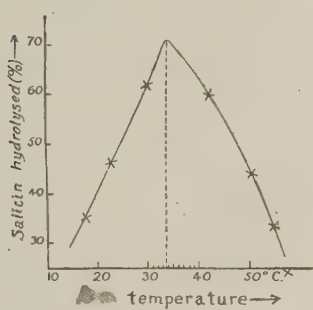


Fig. 5: Substrate concn M/5, Enzyme concn 31×10^{-5} gr per cm^3

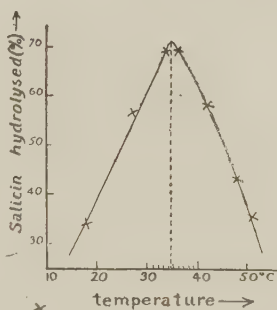


Fig. 6: Substrate concn M/10, Enzyme concn 13.5×10^{-5} gr per cm^3

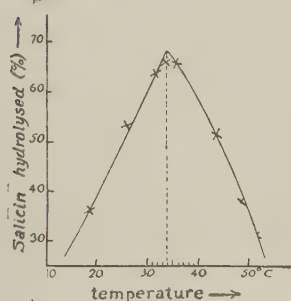


Fig. 7: Substrate concn M/15, Enzyme concn 8.7×10^{-5} gr per cm^3

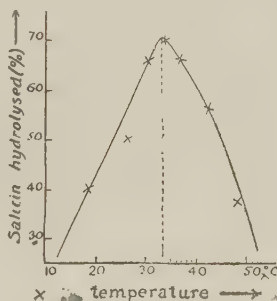


Fig. 8: Substrate concn M/30, Enzyme concn 5.7×10^{-5} gr per cm^3

centrations de substrat : M/5, M/10, M/15, M/30 et M/50. Les résultats obtenus avec ces quantités sont résumés dans le tableau V.

Avec les pourcentages de salicine hydrolysée pour ordonnées, et les températures pour abscisses, ces chiffres donnent les courbes représentées par les figures 5, 6, 7, 8 et 9.

Un simple examen démontre que l'activité de la diastase atteint son point maximum dans ces cinq courbes entre les températures de $+33^{\circ}5$ et $+34^{\circ}5$; en d'autres termes, que la température optimale se trouve au voisinage de $+34$ degrés,

et qu'elle est constante malgré les grandes variations de dilution du substrat et les variations correspondantes de dilution de la diastase.

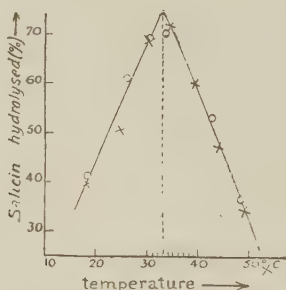


Fig.9.—{ Substrate concⁿ M/50.
Enzyme concⁿ 5×10^{-5} gr per cm³.

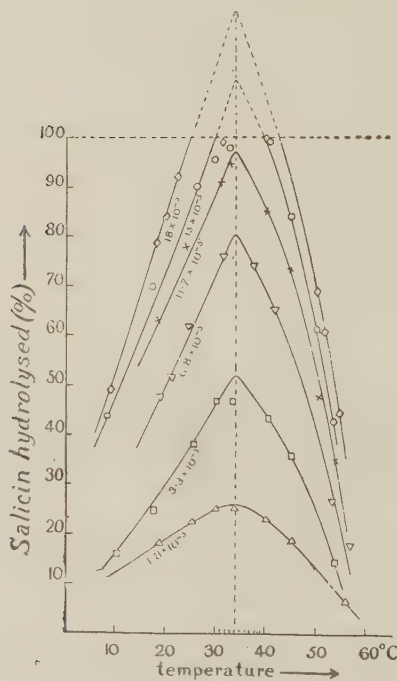


Fig.10.—{ Substrate concⁿ M/30.
Enzyme concⁿ 1.8×10^{-5} to 1.8×10^{-6} gr per cm³.

Il reste maintenant à examiner le cas où la concentration en substrat reste constante tandis que celle de la diastase change. C'est en cela que consiste l'étude, proprement dite, de l'influence de la concentration en diastase sur la température optimale.

Bien que rendue peu nécessaire par ce qui précède, cette dernière expérience complète le travail. On choisit comme concentration de substrat M/30, et la température optimale est déterminée dans une action de 15 heures de durée, avec des quantités de préparation diastasique, comprises entre $1,8 \times 10^{-5}$ et 18×10^{-5} gr. par cent. cube. Les chiffres obtenus sont contenus dans le tableau VI.

TABLEAU VI.

TEMPÉRATURES EXTRÊMES de chaque expérience	SALICINE HYDROLYSÉE P. 100 EN 15 HEURES avec concentration diastasique en grammes par cent. cube					
	$1,8 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-5}$	$6,8 \times 10^{-5}$	$11,7 \times 10^{-5}$	15×10^{-5}	18×10^{-5}
8°5 à 8°3					43,7	
9°5 à 8°5						48,7
10°0 à 10°5		16,0				
17°5					70,0	
17°8 à 17°9		24,7				
18°2 à 18°0						78,7
18°7 à 18°6				63,0		
19°0	18,3					
19°5 à 19°0			47,7			
20°3 à 20°1						84,0
21°5 à 21°1			51,6			
22°5						92,0
24°4				78,0		
24°8 à 24°9			61,7			
25°5 à 25°6	22,5					
25°8 à 25°6		38,0				
26°2					90,0	
30°0					95,3	
30°2	25,2	46,8				
30°4 à 31°6				91,0		
31°1						99,0
31°6 à 31°7			76,0			
32°9 à 33°1				94,7		
33°5		46,8			98,0	
34°0	25,2					
37°6 à 37°8			74,2			
40°0 à 39°9						99,7
40°2	23,0					
40°5		43,3		85,0		
40°7					99,0	
41°8 à 42°0			65,3			
45°0 à 45°2		35,8		73,3	84,0	
45°0 à 45°4	18,8					
49°1 à 49°0	13,5					
50°5 à 50°4					61,3	69,0
51°1 à 51°0				47,7		
52°2 à 51°6						60,7
53°6 à 53°5			26,8			
54°0		14,6			42,7	
54°3				35,0		
55°0						44,3
56°0	6,5					
57°0			18,0			

Ces résultats sont résumés dans les courbes de la figure 10.

Les courbes de la figure 10, aussi bien que la courbe M/30 de la figure 4 et celle de la figure 8, démontrent que la température optimale de la diastase est partout la même, qu'elle est, par conséquent, indépendante de la concentration en diastase. Il en est de même, comme le démontrent deux des courbes de la figure 10, lorsque le rapport de la quantité de diastase à la quantité de substrat est plus que suffisant pour produire une hydrolyse totale du substrat au voisinage de la température optimale. Dans ces deux cas, le point optimal est imaginaire et correspond au point d'intersection des courbes représentant respectivement l'accélération et la destruction de la diastase par la chaleur.

On peut donc dire que la température optimale de la *salicinase* d'amandes douces est indépendante, pour une action d'une durée connue, à la fois de la concentration en substrat et de la concentration en diastase. Cette observation est-elle vraie pour tous les ferments? C'est là une question à laquelle j'espère pouvoir répondre bientôt par de nouvelles expériences avec d'autres types de diastases.

Je signalerai enfin un fait de quelque intérêt, démontré incidemment au cours de ces recherches. Tout récemment, M. Gabriel Bertrand et moi (1) avons trouvé, comme température optimale de la *salicinase* d'amandes douces, 42°5, dans une action de 15 heures de durée — la concentration du substrat étant M/27,4 — c'est-à-dire une température optimale qui dépasse de 8°5 celle de la préparation dont je m'occupe aujourd'hui. Donc une même diastase qui provient de sources différentes peut non seulement se comporter différemment sous l'influence de la température, mais il faut s'attendre aussi à des variations dans des préparations qui ont la même origine.

(1) *Loc. cit.*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU GONOCOQUE

par P. FORGEOT

(Travail du laboratoire de M. Morax).

La plupart des auteurs attachent à la recherche imaginée par V. Lingelsheim, pour le diagnostic différentiel des microbes du groupe *gonocoque*, *méningocoque*, *catarrhalis*, une très grosse importance. On sait que cette méthode est basée sur les propriétés fermentatives des microbes vis-à-vis des sucres; celles-ci sont appréciées par le « virage » au rouge plus ou moins accusé de la teinture de tournesol dont le milieu de culture sucré est additionné. On résume, généralement, l'action sur les sucres des trois microbes dans le tableau suivant :

MICROBES	DEXTROSE	LÉVULOSE	GALACTOSE	MANNITE	DULCITE	SACCHAROSE	MALTOSE	LACTOSE	INULINE
<i>Méningocoque</i> .	+	0		0	0	0	+	0	0
<i>Catarrhalis</i> . .	0	0		0	0	0	0	0	0
<i>Gonocoque</i> . .	+	0	0	0	0	0	0	0	0

On voit que : le *catarrhalis* ne fait fermenter aucun sucre : le *gonocoque* fait fermenter uniquement le dextrose, le *méningocoque* fait fermenter à la fois le dextrose et le maltose.

M. le D^r Morax, qui a pratiqué de très nombreuses recherches sur les caractères fermentatifs des gonocoques provenant soit de l'urètre, soit, plus souvent, de l'œil, avait toujours vu jusqu'ici se vérifier la règle posée par V. Lingelsheim.

Au cours de recherches sur la toxine gonococcique, nous avons examiné également un grand nombre d'échantillons de gono-

coques, et nous avons eu la surprise de constater que l'un d'eux, que nous dénommerons « *Vid...* », avait la curieuse propriété de faire fermenter d'une façon fort nette à la fois le dextrose et le maltose. Ce gonocoque a été isolé d'une ophtalmie par M. Morax, dans son service de l'hôpital Lariboisière.

Il s'agissait d'un enfant de quatre ans, *Vid...*, qui fut présenté le 8 novembre 1912, pour une conjonctivite purulente bilatérale avec sécrétion assez abondante, mais sans lésions de la cornée. L'examen de la sécrétion montrait l'aspect typique des gonocoques intracellulaires, et le tube de gélose ascite ensemencé donna en vingt-quatre heures de nombreuses colonies ayant tous les caractères du gonocoque. L'enfant fut traité à la consultation et son affection ne présenta aucune particularité. L'étiologie de son infection oculaire n'avait pu être précisée. Le seul renseignement obtenu indiquait l'existence de pertes blanches assez abondantes chez la mère de l'enfant. L'examen bactériologique de ces pertes ne fut pas pratiqué.

Nous avons alors recherché comment ce gonocoque se comportait vis-à-vis d'autres sucres, et nous avons vu qu'il faisait fermenter également le galactose et la dulcité. Voici, par comparaison avec le tableau précédent, la série des réactions sucrées du gonocoque « *Vid...* »

MICROBES	DEXTROSE	LÉVULOSE	GALACTOSE	MANNITE	DULCITE	SACCHAROSE	MALTOSE	LACTOSE	INULINE
<i>Méningocoque</i> .	+	0	0	0	0	0	+	0	0
<i>Catarrhalis</i> . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gonocoque</i> . .	+	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vid.</i>	+	0	+	0	+	0	+	0	0

Nous sommes donc en présence d'un microbe qui, par son origine et son histoire clinique, paraît être nettement un gonocoque et qui, par ses réactions sucrées, se rapproche du méningocoque.

Ce microbe appartient-il à l'une de ces deux espèces ou à une espèce différente?

Il y a lieu de remarquer, en faveur de la première hypothèse,

que l'affection humaine dont il a été isolé a présenté les caractères habituels de l'infection blennorragique, avec cette restriction qu'il s'agissait d'un enfant mâle, infecté directement dans sa muqueuse oculaire sans infection urétrale. On rencontre parfois des cas de ce genre dus à une contamination indirecte par les linges ou objets de toilette. En admettant la nature gonococcique des pertes maternelles, l'infection de l'enfant s'expliquerait par le transport du pus vaginal.

On ne connaît, d'ailleurs, qu'un très petit nombre d'observations où d'autres agents infectieux morphologiquement analogues au gonocoque (*diplocoques ne prenant pas le Gram*) ont été considérés comme susceptibles de produire l'ophtalmie purulente (pseudo-gonocoques de Brons). Frenkel a bien cité un cas d'infection conjonctivale par le méningocoque, mais cette étiologie n'a généralement pas été admise.

Les essais d'agglutination de notre microbe par le sérum antiméningococcique ont été nettement négatifs aux taux ci-après : 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, même après 12 heures.

Dans le but de rechercher s'il existait des caractères différentiels entre le gonocoque « *Vid...* » et un gonocoque de même origine, nous avons étudié parallèlement les résultats de l'inoculation de ce premier microbe (vivant ou mort) avec ceux fournis par l'inoculation du gonocoque « *Leroy* », provenant d'une ophtalmie gonococcique de l'adulte.

MICROBES VIVANTS. — Sujet d'expérience : cobaye de 300 à 350 grammes.

a) *Sous la peau.* La valeur d'une spatule ordinaire de gonocoque « *Vid...* » représentant le grattage de la surface d'un tube de culture de 24 heures sur gélose-ascite, détermine, le lendemain, l'apparition d'un œdème du volume d'une noix au niveau duquel la peau est rouge vif; cet œdème augmente, et, après 36 heures, on voit apparaître une petite eschare ayant les dimensions d'une lentille, puis l'œdème diminue, l'eschare tombe le 4^e jour et laisse sourde une goutte de pus. — Même lésions avec le gonocoque Leroy.

b) *Dans la veine.* La moitié de la dose précédente détermine la mort dans la nuit; à l'autopsie, on note simplement une congestion violente des poumons. — Mêmes lésions avec le gonocoque Leroy.

c) *Dans le péritoine.* La même dose que dans la veine donne la mort dans la nuit. A l'autopsie, on trouve un abondant exsudat péritonéal qui, ensemenché, donne des cultures du gonocoque. Le sang au cœur est stérile. — Mêmes lésions avec le gonocoque Leroy.

MICROBES MORTS. — Ces microbes, obtenus par le râclage des cultures sur boîtes de Roux, sont mis à dessécher pendant 48 heures sur boîtes de Petri,

dans le vide sulfurique, puis triturés dans un mortier stérile, pour les réduire en poudre fine.

a) *Injectations sous-cutanées.* Nous avons injecté les doses suivantes de « Vid... » : 2, 1 et 1/10 de centigramme. Seules les doses de 2 et 1 centigramme donnent des lésions appréciables qui peuvent se résumer ainsi : le lendemain, œdème mou variant, suivant la dose, d'une noix à une noisette ; tache violette à la peau dont les dimensions varient de 1 millimètre à 0^{mm}50 ; 3 jours après, l'eschare, d'abord humide, commence à sécher, puis s'élimine avec le 5^e jour. L'abcès se cicatrise très rapidement. Avec des doses supérieures à 5 centigrammes, on tue le cobaye en 12-24 heures.

b) *Injectations intraveineuses.* Les doses de 2, 1 centigramme du gonocoque « Vid... » déterminent la mort dans la nuit. Si on force la dose (5 centigrammes et au-dessus), on a la mort en quelques minutes (30 minutes habituellement) ; l'animal titube immédiatement, présente de l'apnée, puis tombe sur le côté et meurt. A l'autopsie, on trouve la rate hypertrophiée et noirâtre, le foie congestionné, ainsi que les reins ; l'intestin est normal.

Au-dessous de 1 centigramme, la mort est plus tardive ; avec 1/10 de centigramme, on a la mort en 24 heures une fois sur deux. *C'est la dose minima mortelle.*

Le gonocoque Leroy donne les mêmes lésions aux mêmes doses.

Au cours de ces inoculations, un certain nombre d'animaux ayant résisté, nous nous sommes demandé s'ils n'auraient pas acquis une certaine immunité vis-à-vis de doses plus élevées.

Notre premier essai a porté sur le cobaye, dont 4 avaient été injectés dans la veine aux doses de 1/10 et 1/100 de centigramme et 2 sous la peau à la dose de 2 centigrammes. Tous reçurent, dans la veine, 1/2 centigramme, dose sûrement mortelle dans la nuit.

Voici les résultats :

PREMIÈRE INJECTION (27 décembre 1912)	DEUXIÈME INJECTION (17 janvier 1913)	RÉSULTATS
2 centigr. sous la peau . .	< 1/2 centigr. dans la veine. Id.	Mort dans la nuit. Mort dans la nuit.
1/10 ^e centigr. dans la veine.	< 1/2 centigr. dans la veine. Id.	Résiste. Résiste.
1/100 ^e centigr. dans la veine.	< 1/2 centigr. dans la veine. Id.	Résiste. Résiste.
Témoins.	< 1/2 centigr. dans la veine. Id.	Mort dans la nuit. Mort dans la nuit.

Il résulte de cet essai que l'injection *sous-cutanée* de doses assez élevées de microbes morts ne confère aucune immunité, alors que l'injection *intraveineuse*, même à dose faible, permet

aux animaux de résister à une dose, mortelle dans la nuit, pour les témoins.

Nous avons répété cet essai d'immunisation sur 6 nouveaux cobayes en commençant par le 1/100 de centigramme (le 1/10 de centigramme amenant parfois la mort, comme nous l'avons dit plus haut) : l'un de ces animaux est mort accidentellement.

Nous résumerons, dans le tableau ci-dessous, cette expérience.

NUMÉROS des Cobayes	DATE ET DOSE de la première injection	DATE ET DOSE de la deuxième injection	DATE ET DOSE de la troisième injection
64 F	9 avril 1913 : 1/100 ^e centigr. aucun symptôme.	2 mai 1913 : 1/10 ^e centigr. aucun symptôme.	16 mai 1913 : 1/2 centigr. aucun symptôme.
65 F	9 avril 1913 : 1/100 ^e centigr. aucun symptôme.	2 mai 1913 : 1/10 ^e centigr. aucun symptôme.	16 mai 1913 : 1/2 centigr. aucun symptôme.
66 F	9 avril 1913 : 1/100 ^e centigr. aucun symptôme.	2 mai 1913 : 1/10 ^e centigr. aucun symptôme.	16 mai 1913 : 1/2 centigr. aucun symptôme.
67 F	9 avril 1913 : 1/100 ^e centigr. aucun symptôme.	2 mai 1913 : 1/10 ^e centigr. aucun symptôme.	16 mai 1913 : 1/2 centigr. aucun symptôme.
68 F	9 avril 1913 : 1/100 ^e centigr. aucun symptôme.	2 mai 1913 : 1/10 ^e centigr. aucun symptôme.	16 mai 1913 : 1/2 centigr. aucun symptôme.
Témoin de la 1 ^{re} injection.	9 avril 1913 : 1/100 ^e centigr. Rien.	"	
Témoin de la 2 ^e injection.	"	2 mai 1913 : 1/100 ^e centigr. Très mal le soir mais se remet dans la nuit.	
Témoin de la 3 ^e injection.	"	"	16 mai 1913 : 1/2 centigr. mort dans la nuit.

Ces 5 cobayes ont enfin reçu une 4^e injection intraveineuse de 1 centigramme le 28 mai 1913. Tous ont succombé dans la nuit.

Conclusion. — On peut arriver à donner au cobaye, par injection intraveineuse de petites doses *faiblement* croissantes de microbes morts, une certaine immunité.

Avant la 4^e épreuve, nous avons prié M. M. Nicolle de prélever une certaine quantité de sang du cœur du cobaye 67 F ; le len-

